

Estudio de la sensibilidad de aislados de *Drechslera teres* a diferentes fungicidas en
cebada

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Vegetal.*

Carlos Andrés Mejía Álvarez

Ingeniero Agrónomo-Universidad del Magdalena, Colombia -2014

Cátedra de Fitopatología-Facultad de Agronomía (UBA)



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Marcelo Anibal Carmona

Ingeniero Agrónomo (UBA)

Magister Scientiae en Producción vegetal (UBA)

Dr. Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP)

Codirector de tesis

Francisco José Sautua

Ingeniero Agrónomo (UBA)

Master (Universidad de Perugia, Italia)

Dedicatoria:

Dios, por estar siempre guiándome por el camino del éxito.

Mi Madre Mariluz Álvarez y a mi tía María Alvarez por sus esfuerzos constantes que le aportaron al desarrollo de mi vida profesional.

A mi padre Pedro Mejía y a mi tía Yolanda Mejía por sus consejos en mi camino por la vida.

Mis hermanos Deimer, Alvaro y Jaime por haber confiado siempre en mí.

A mi prometida Angie Ochoa, por transformar mis días con su sonrisa.

A mis sobrinas Sara y Thaliana.

A mi primo Manuel Rivera por su excelente gestión para coordinar el viaje a la Argentina.

A mi tía Nazly Sanguino y José Alvarez por su apoyo incondicional.

A mi gran amiga Grey Mary Pimienta.

Agradecimientos:

A Marcelo Carmona y Francisco Sautua, por sus conocimientos, orientaciones, recomendaciones y apoyo incondicional en los momentos más difíciles de la investigación.

A Elida Patane por su buena energía y excelente gestión desde la secretaría de la Cátedra de Fitopatología.

A la Universidad de Buenos Aires, por permitirme crecer a nivel profesional y poner a disposición todas sus instalaciones para el desarrollo de esta investigación.

A la Gobernación del Magdalena por financiar mi beca de maestría en la Argentina.

A Colciencias y Colfuturo por gestionar los recursos de mi sostenimiento y matrícula para mis estudios de maestría.

A Juan Pablo Morello por su colaboración en la aplicación de fungicida en los ensayos *in vivo*.

A Mariano Alvarez (Cooperativa Agrícola Ganadera Limitada de Ascensión), Cervecería y Maltería Quilmes, Lucas Martin D'Alessandri (Coopdefensa) y a Fidel Cortese (Ing. Agr. Consultor privado), quienes ayudaron a recolectar y enviar las muestras de semillas de cebada.

Al Ing. Raúl Zapata por facilitar la cámara de Neubauer para los ensayos de sensibilidad *in vivo*.

A la Dra. Ana Romero por facilitar el carbonato de calcio para la preparación de medio V8.

Declaración:

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

Ing. Carlos Mejía Álvarez

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE FIGURAS	XI
ABREVIATURAS	XII
Resumen	XIII
Abstract.....	XIV
Capítulo I: Introducción general.....	15
1.1 INTRODUCCIÓN.....	16
1.1.1 El cultivo de la cebada	16
1.1.2 Enfermedades de la cebada causadas por hongos en la Argentina	16
1.1.3 Mancha en red de la cebada: ocurrencia e importancia económica.....	17
1.1.4 Grupos de fungicidas utilizados en el manejo de la mancha en red en la Argentina	21
1.1.5 Conceptos dentro del estudio de la resistencia de hongos a fungicidas.....	22
1.1.6 Resistencia a fungicidas.....	24
1.1.7 Estudios de sensibilidad a fungicidas y mutaciones de <i>D. teres</i>	25
1.1.8 Sensibilidad <i>in vitro</i> en otros hongos fitopatógenos.....	26
1.1.9 Contexto actual del monitoreo de la sensibilidad de <i>D. teres</i> a fungicidas en la Argentina	26
1.2 OBJETIVOS.....	28
1.3 HIPÓTESIS	28
Capítulo II: Aislados de <i>Drechslera teres</i>	29
2. 1 INTRODUCCIÓN.....	30
2.1.1 Métodos de detección de los patógenos en la semilla	30
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.2.1 Origen de las muestras.....	31
2.2.2 Aislamiento de <i>Drechslera teres</i> a partir de semillas de cebada	31
2.2.3 Preparación de medio de cultivo.....	33

2.2.4 Mantenimiento de los aislados.....	34
2.3 RESULTADOS	34
2.4 DISCUSION.....	35
2.5 CONCLUSIONES.....	37
Capítulo III: Morfología de los aislados de <i>Drechslera teres</i>	38
3.1 INTRODUCCIÓN.....	39
3.2 METODOLOGÍA.....	40
3.2.1 Preparación de medio de cultivos	40
3.2.1.1 Medio V8 - 20% y V8 - 10%	40
3.2.1.2 Agar papa glucosado (APG).....	40
3.2.1.3 Medio extracto de tomate triple (ETT).....	40
3.2.1.4 Puré de tomate (PT)	40
3.2.1.5 Concentrado de tomate 10 % (CT-10%) y 5% (CT-5%).....	40
3.2.1.6 Agar poroto lima (APL).....	41
3.2.1.7 Agar poroto mung (APM).....	41
3.2.2 Aislados	41
3.2.3 Medición de los conidios de <i>D. teres</i>	41
3.2.4 Inducción de la esporulación con otros medios de cultivo	42
3.2.5 Análisis de los datos	42
3.3 RESULTADOS	43
3.3.1 Caracterización morfológica de los aislados de <i>D. teres</i> obtenidos de semillas de cebada de distintas localidades	43
3.3.2 Inducción de la esporulación con otros medios de cultivo	43
3.4 DISCUSIÓN.....	46
3.5 CONCLUSIONES.....	47
Capítulo IV: Sensibilidad <i>in vitro</i> de los aislados de <i>Drechslera teres</i>	48
4.1 INTRODUCCIÓN.....	49
4.2 METODOLOGÍA.....	49
4.2.1 Determinación de la concentración inhibitoria media (CI ₅₀).....	50
4.2.2 Clasificación de la potencia de los fungicidas más frecuentemente usados en el cultivo de cebada para <i>D. teres</i>	51
4.2.3 Determinación del factor de reducción de sensibilidad (FRS)	51
4.2.4 Análisis estadístico	52

4.3 RESULTADOS	52
4.3.1 Sensibilidad <i>in vitro</i> de los aislados de <i>D. teres</i>	52
4.3.2 Factor de reducción de la sensibilidad (FRS)	60
4.4 DISCUSIÓN.....	61
4.5 CONCLUSIONES.....	64
Capítulo V: Sensibilidad <i>in vivo</i> de aislados de <i>Drechslera teres</i>	65
5.1 INTRODUCCIÓN.....	66
5.2 METODOLOGÍA.....	67
5.2.1 Localización.....	67
5.2.2 Evaluación de la sensibilidad <i>in vivo</i>	67
5.2.3 Incidencia en semillas de cebada	67
5.2.4 Tratamiento químico de semillas de cebada	68
5.2.5 Verificación de la susceptibilidad del cultivar de cebada a <i>D. teres</i>	69
5.2.6 Sensibilidad <i>in vivo</i> de los aislados de menor y mayor CI ₅₀ proveniente de la prueba <i>in vitro</i> a la mezcla de fungicida FEP	70
5.2.7 Aplicación de fungicida y equipo de aplicación.....	71
5.2.8 Incidencia de la enfermedad.....	72
5.2.9 Severidad de la enfermedad.....	72
5.2.10 Análisis estadístico	73
5.3 RESULTADOS	73
5.3.1 Susceptibilidad del cv. Shakira a <i>D. teres</i>	73
5.3.2 Sensibilidad <i>in vivo</i> de los aislados de <i>D. teres</i>	74
5.4 DISCUSIÓN.....	76
5.5 CONCLUSIONES.....	79
Capítulo VI: Consideraciones finales.....	80
Capítulo VII: Bibliografía.....	83
Capítulo VIII: Apéndice.....	99

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras de semillas de cebada según número, código (denominación), variedad, origen y campaña agrícola.....	32
Tabla 2. Aislados de <i>D. teres</i> utilizados en la medición de los conidios de distintos orígenes geográficos, variedades y campañas agrícolas.	41
Tabla 3. Largo de los conidios de <i>D. teres</i> obtenidos de semillas de cebada de distintas localidades. D.E: Desviación estándar.	44
Tabla 4. Ancho de los conidios de <i>D. teres</i> obtenidos de semillas de cebada de distintas localidades D.E: Desviación estándar.	44
Tabla 5. Número de septos de los conidios de <i>D. teres</i> obtenidos de semillas de cebada de distintas localidades. D.E: Desviación estándar.	45
Tabla 6. Valores medios del largo, ancho y número de septos de los conidios de <i>D. teres</i> por región. D.E: Desviación estándar. N: Norte; S: Sur.	45
Tabla 7. Mezclas de fungicidas y concentración (g/L).	50
Tabla 8. CI ₅₀ (μg. mL ⁻¹) media de diez aislados de <i>D. teres</i> a cinco mezclas de fungicidas. EE: error estándar de las medias de CI ₅₀ por región. CI ₅₀ media de dos experimentos.	53
Tabla 9. Valores medios de CI ₅₀ a cinco fungicidas para cada aislado de <i>D. teres</i> . EE: Error estándar de las medias de CI ₅₀ de cada aislado. CI ₅₀ media de dos experimentos.	53
Tabla 10. Concentración inhibitoria media (CI ₅₀) promedio de diez aislados <i>D. teres</i> para los diferentes fungicidas analizados. EE: Error estándar de las medias de CI ₅₀ de cada fungicida. CI ₅₀ media de dos experimentos.	54
Tabla 11. Dosis efectiva capaz de inhibir el 50% del crecimiento micelial relativo (CI ₅₀ , μg mL ⁻¹) de aislados de <i>D. teres</i> para la mezcla de fungicida isopiraxam 12,5% + azoxistrobina 20%.	56
Tabla 12. Dosis efectiva capaz de inhibir el 50% del crecimiento micelial relativo (CI ₅₀ , μg mL ⁻¹) de aislados de <i>D. teres</i> para la mezcla de fungicida fluxapyroxad 5% + epoxiconazole 5% + piraclostrobina 8,1%.	57
Tabla 13. Dosis efectiva capaz de inhibir el 50% del crecimiento micelial relativo (CI ₅₀ , μg mL ⁻¹) de aislados de <i>D. teres</i> para la mezcla de fungicida trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5% + bixafen 12,5%.	58
Tabla 14. Dosis efectiva capaz de inhibir el 50% del crecimiento micelial relativo (CI ₅₀ , μg mL ⁻¹) de aislados de <i>D. teres</i> para la mezcla de fungicida azoxistrobina 20% + cyproconazole 8%.	59
Tabla 15. Dosis efectiva capaz de inhibir el 50% del crecimiento relativo micelial (CI ₅₀ , μg mL ⁻¹) de aislados de <i>D. teres</i> para la mezcla de fungicida trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5%.	60
Tabla 16. Factor de reducción de sensibilidad de los aislados de <i>D. teres</i> analizados. ..	61
Tabla 17. Descripción de los tratamientos.	68
Tabla 18. Incidencia de hongos en semillas de cebada tratada con Iminoctadine (30% EC), no tratadas sin y con desinfección.	68

Tabla 19. Severidad en hojas de cebada inoculadas con los aislados de menor y mayor CI ₅₀ de <i>D. teres</i> y tratadas con la mezcla fungicida fluxapyroxad (5%) + epoxiconazole (5%) + pyraclostrobina (8,1%) antes y después de inocular.....	76
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Mancha en red de la cebada con el patrón de desarrollo de la lesión tipo martillo, b) y c) presencia de clorosis y necrosis en hoja de cebada a causa de la mancha en red. Fuente: Mejía, 2017.....	18
Figura 2. Ciclo de vida de <i>P. teres</i> , evidenciando las fases iniciación y dispersión de la mancha en red. Adaptado de Jorgensen <i>et al.</i> (2004).	19
Figura 3. Localidades de la provincia de Buenos Aires, La Pampa y Entre Ríos, origen de las muestras de semillas de cebada. Fuente: Google Maps (2018).	33
Figura 4. Incidencia (%) de <i>D. teres</i> en muestras de semillas de cebada provenientes de diferentes localidades y campañas agrícolas.....	34
Figura 5. Prevalencia de <i>D. teres</i> en muestras de semillas de cebada.	35
Figura 6. a) Semilla de cebada con esporulación de <i>D. teres</i> b) Conidios de <i>D. teres</i> de color marrón (40X).	35
Figura 7. Conidios de <i>D. teres</i> con cicatriz visible en el extremo redondeado, punto de unión al conidióforo (flecha negra).....	39
Figura 8. a) Caja de Petri con medio V8 - 20% inoculada con cuatro discos de micelio de <i>D. teres</i> b) Micelio (flecha punteada) y esporulación (flecha sólida) de <i>D. teres</i> sobre medio de cultivo V8 – 20 %.....	42
Figura 9. Conidios de <i>D. teres</i> (40X). a) DT, b) 36T y c) FT.....	45
Figura 10. Crecimiento micelial de <i>D. teres</i> (aislado 30T) sobre medio de cultivo APG modificado con las concentraciones 0; 0,004; 0,01; 0,4; 1, 10, 40 y 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de mezclas de fungicidas.	55
Figura 11. Bolsas plásticas sobre las macetas para favorecer la infección por <i>D. teres</i> ...70	
Figura 12. a) Escala de 10 puntos de Tekauz (1985). b) Infección de genotipos de cebada por <i>D. teres</i> , 10 días después de la inoculación. Fuente: Jalli, 2010.....	71
Figura 13. Aplicación de fungicida a las plantas de cebada en estado fisiológico Z 1.4.	72
Figura 14. a) Marchitamiento de hojas de cebada (Z 1.5) inoculadas con <i>D. teres</i> a los 7 días después de la inoculación. Hojas nuevas (verdes) sin enfermedad b) Presencia de necrosis y clorosis en hojas de cebada a los 5 días después de la inoculación con <i>D. teres</i>	74
Figura 15. Esporulación de <i>D. teres</i> sobre segmento de hoja de cebada cv. Shakira.	74
Figura 16. a) Desarrollo de los primeros síntomas foliares (flechas negras) de la mancha en red en hojas de cebada después de 48 horas de inoculación con <i>D. teres</i> . b) Mancha foliar característica de la enfermedad (flecha negra).	75
Figura 17. Severidad de la enfermedad en las hojas de cebada cv. Shakira inoculadas con <i>D. teres</i> , estado de crecimiento Z.1.5.	79

ABREVIATURAS

AD: Agua destilada
ADE: Agua destilada estéril
APG: Agar papa glucosado
APGc: Agar papa glucosado comercial
APL: Agar poroto lima
APM: Agar poroto mung
AZC: Azoxistrobina 20% + cyproconazole 8%
Bs As: Buenos Aires
CI₅₀: Concentración inhibitoria del 50% del crecimiento micelial o germinación.
C14: Carbono 14
CT - 10%: Medio de cultivo concentrado de tomate 10%
CT - 5%: Medio de cultivo concentrado de tomate 5%
cv.: Cultivar
EC: Emulsión concentrada
ETT: Medio extracto de tomate triple
FAUBA: Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires
FEP: Fluxapyroxad 5% + epoxiconazole 5% + piraclostrobina 8,1%
FRAC: Fungicide Resistance Action Committee
FRS: Factor de reducción de sensibilidad
IAZ: Isopyrazam 12,5% + azoxistrobina 20%
IDMs: Inhibidores de la desmetilación
IQe: Inhibidores de la quinona externa
ISDHs: Inhibidores de la succinato deshidrogenasa
MR: Mancha en red
PCR: Polymerase chain reaction
PT: Medio puré de tomate
SBI: Inhibidores de la biosíntesis del esterol
TP: Trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5%
TPB: Trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5% + bixafen 12,5%
UV: Ultravioleta
V8 - 10%: Medio de cultivo V8 al 10%
V8 - 20%: Medio de cultivo V8 al 20%
W: unidad de medida para representar la potencia eléctrica (Watt)

Estudio de la sensibilidad de aislados de *Drechslera teres* a diferentes fungicidas en cebada

Resumen

La “Mancha en red” ocasionada por *Drechslera teres* (Sacc.) Shoemaker, es una de las principales enfermedades del cultivo de la cebada en la Argentina. Los objetivos principales de este proyecto fueron: 1) Obtener diez aislados de *D. teres* provenientes del área de producción de cebada de Argentina, cinco de la región norte y cinco de la región sur; 2) establecer el perfil de sensibilidad *in vitro* de cada aislado a las mezclas de fungicida fluxapyroxad 5% + epoxiconazole 5% + pyraclostrobina 8,1% (FEP), isopyrazam 12,5% + azoxystrobina 20%, azoxystrobina 20% + cyproconazole 8%, trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5% y trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5% + bixafen 12,5%; y 3) evaluar la sensibilidad *in vivo* de los aislados más y menos sensibles a la aplicación del fungicida que haya resultado con mayor fungitoxicidad en la prueba *in vitro*. Para cada fungicida se generó un gradiente con 8 concentraciones de principio activo (0; 0,004; 0,01; 0,4; 1; 10; 40 y 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en medio estéril agar papa glucosa. Las cajas de Petri se incubaron a 24°C en oscuridad durante 5 días. Se calculó el crecimiento micelial relativo, y posteriormente se determinó la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento micelial (CI_{50}) mediante regresión logarítmica simple. En los ensayos *in vivo* se evaluó la eficacia de la mezcla de fungicida FEP sobre plantas inoculadas con una concentración de 5×10^3 conidios mL^{-1} de *D. teres* antes y después de la inoculación con el patógeno. Los valores de CI_{50} variaron entre 0,004 y 0,527 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, demostrando que las mezclas de fungicidas analizados son altamente fungitóxicas a los aislados de *D. teres*. La eficacia del fungicida FEP *in vivo* fue en promedio 99,9%, tanto en la aplicación preventiva como en la curativa; confirmando una correlación de la sensibilidad *in vitro* e *in vivo*.

Palabras claves: Inhibidores de la quinona externa, inhibidores de la desmetilación, inhibidores de la succinato deshidrogenasa, sensibilidad *in vitro*, mancha en red, sensibilidad *in vivo*, cebada.

Study of the sensitivity of *Drechslera teres* isolates to different fungicides in barley

Abstract

Net blotch caused by *Drechslera teres* (Sacc.) Shoemaker is one of the main diseases of barley in Argentina. The main objectives of this project were: 1) to isolate ten strains of *D. teres* from the barley production area of Argentina, five from the northern region and five from the southern region ; 2) to establish the *in vitro* sensitivity profile of each isolate to mixtures of fungicide: fluxapyroxad 5% + epoxiconazole 5% + pyraclostrobin 8,1% (FEP), isopyrazam 12,5% + azoxystrobin 20%, azoxystrobin 20% + cyproconazole 8%, trifloxystrobin 15% + prothioconazole 17,5% and trifloxystrobin 15% + prothioconazole 17,5% + bixafen 12,5%; and 3) to evaluate the *in vivo* sensitivity of the most and least sensitive isolates to the application of the fungicide that has resulted in the most fungitoxicity in the *in vitro* test. For each fungicide a gradient was generated with 8 concentrations of active ingredient (0; 0,004; 0,01; 0,4; 1; 10; 40 and 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in sterile medium agar potato glucose. Petri dishes were incubated at 24°C in darkness for 5 days. Relative mycelial growth was calculated, and then the inhibitory concentration of 50% micelial growth (EC_{50}) was determined by simple logarithmic regression. *In vivo* tests evaluated the efficacy of the fungicide mixture FEP on plants inoculated with a concentration of 5×10^3 conidia mL^{-1} of *D. teres* before and after inoculation with the pathogen. EC_{50} values ranged between 0,004 and 0,527 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, demonstrating that the fungicide mixtures analyzed are highly fungitoxic to *D. teres* isolates. The efficacy of the fungicide FEP *in vivo* was on average 99,9%, both in preventive and curative application, confirming a correlation of sensitivity *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: External quinone inhibitors, demethylation inhibitors, succinate dehydrogenase inhibitors, *in vitro* sensitivity, net blotch, *in vivo* sensitivity, barley.

Capítulo I

Introducción general

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 El cultivo de la cebada

La cebada (*Hordeum vulgare* L.) es uno de los cereales más importantes en el mundo. La cebada fue principalmente usada para el suministro de alimento humano en el siglo pasado, pero hoy se cultiva significativamente como alimento para animales, producción de malta y alimento para humanos. Este cereal es muy bien conocido como modelo para metodologías de mejoramiento de plantas, genética, citogenética, patología, virología y estudios de biotecnología. La cebada se produce principalmente en climas y suelos no favorables del mundo. La amplia adaptación a estas condiciones mencionadas anteriormente, la utilidad versátil principalmente para alimentación animal, la industria de la cerveza y la malta como materia prima son las principales razones por las cuales la cebada ha sido utilizada por el hombre durante siglos. La cebada es muy importante en términos de producción (FAO, 2004), a septiembre de 2018 se produjeron a nivel mundial 142.726 toneladas métricas de las cuales Argentina representa el 2,8 % (USDA, 2018).

En Argentina, la zona agronómicamente apta para producir cebada cervecera se ubica en su mayor parte en la provincia de Buenos Aires, seguido por el sur de Santa Fe, sur de Córdoba, noreste de la Pampa y en menor medida, en San Luis (MAGyP, 2016). Para la campaña 2015/2016 se estimó una producción de cebada de 4,9 millones de toneladas, superior en un 69% a la campaña anterior, constituyendo la segunda mayor producción histórica de cebada cervecera en la Argentina (MAGyP, 2016). Para la campaña 2018/2019 se estima una producción entre 4 y 4,5 millones de toneladas (Cattaneo, 2018a).

1.1.2 Enfermedades de la cebada causadas por hongos en la Argentina

El cultivo de cebada en Argentina puede ser afectado por las siguientes enfermedades (Kiehr *et al.*, 2016):

- La roya de la hoja (*Puccinia hordei*)
- La roya negra del tallo (*Puccinia graminis*)
- La escaldadura (*Rhynchosporium commune*)
- La mancha borrosa (*Bipolaris sorokiniana*)
- El salpicado necrótico (*Ramularia collo-cygni*)
- La mancha en red (*Drechslera teres*)

1.1.3 Mancha en red de la cebada: ocurrencia e importancia económica

La mancha en red (MR) es una enfermedad ocasionada por *D. teres* (Sacc.) Shoemaker. En la Argentina, la MR aparece en todas las regiones donde se cultiva la cebada, desde los primeros estados vegetativos (Moschini *et al.*, 1996). En Argentina, afecta mayormente al norte de la provincia de Buenos Aires (Carmona *et al.*, 1992) y al sur de Santa Fe y Córdoba (Carmona y Sautua, 2016). Para el año 1991, la MR junto con la escaldadura (*Rhynchosporium secalis*) fueron clasificadas como las enfermedades más prevalentes en la provincia de Buenos Aires (Carmona y Barreto, 1995). En 1991 y 1993 en Argentina, los promedios y máximos valores registrados de *D. teres* en semilla fueron: 13,5% y 35,0% y 11,0% y 57,0% respectivamente (Barreto y Carmona, 1993). En el país, la importancia de esta enfermedad se ha incrementado en las últimas décadas como consecuencia de la adopción de sistemas de labranza cero (“siembra directa”) y el monocultivo (Kiehr *et al.*, 2016). Reportes fitopatológicos, confirman que la MR es una enfermedad endémica, de alta prevalencia e incidencia en Argentina (Carmona y Barreto, 2008). Durante los últimos años, la enfermedad continuó siendo prevalente tanto a campo como en semillas (Fernández, 2018).

Se han estimado pérdidas en rendimiento entre 8,7 y 26% en cultivares de susceptibilidad reconocida (cv Kombar) y resistencia incompleta (cv UC 603) en EE.UU (Steffenson *et al.*, 1991), 15 y 25% cuando los niveles de la enfermedad alcanzaron proporciones epidémicas en 1992 en Francia (Albertini *et al.*, 1995), 14 y 29% en variedades de cebada con distintos niveles de resistencia a *D. teres* en Marruecos (El Yousfi y Ezzahiri, 2002), 32% para niveles elevados de la enfermedad en Australia (Jayasena *et al.*, 2002), 7,7 y 21,2% en Etiopía (Galano *et al.*, 2008), y en Argentina hay informes de daños estimados del 20% (Carmona *et al.*, 2011).

La MR reduce los componentes del rendimiento de la cebada, es decir, el número de granos por espiga y número de espigas por unidad de superficie (Jordan, 1985; Burleigh *et al.*, 1988) y peso de mil granos (Jordan, 1985; Hundie *et al.*, 2004; Galano *et al.*, 2008).

D. teres es un patógeno necrotrófico, que mata a las células de la hoja de cebada con la ayuda de enzimas, ocasionando manchas cloróticas en forma de red (Fig.1), o lesiones parduzcas irregulares rodeadas por un halo amarillo (Kühne *et al.*, 2011). Los síntomas pueden afectar además a otras estructuras como espigas y granos en niveles de enfermedad avanzada (Pereyra, 1996). La infección en las inflorescencias puede pasar a la cariósipide y posteriormente la infección presente en la semilla se transmite a las plántulas (Youcef-Benkada *et al.*, 1994; Carmona *et al.*, 2008). Las fitotoxinas involucradas en la patogenicidad de *D. teres* son las toxinas A, B y C (Sarpeleh *et al.*, 2009). Sobre los tejidos muertos (lesiones o manchas) en la presencia de luz diurna, comienza la formación de los conidióforos (Reis, 1991).

La temperatura óptima para la infección de las hojas de cebada está en el rango 15 - 25°C (Carmona *et al.*, 2011) y la infección puede ocurrir después de períodos de mojado de 5 horas, pero es más rápida cuando las condiciones de humedad persisten por 10 - 30 horas (Plant Health Australia, 2009). En suma, la temperatura combinada con horas de mojado en la superficie de la hoja es un factor predisponente para la infección (van den Berg y Rossnagel, 1991). Es así como, la temperatura juega un rol importante en la virulencia y patogenicidad de *D. teres* (Were *et al.*, 2016). *In vitro* la temperatura óptima para el desarrollo de la colonia de *D. teres* oscila entre 20 y 26°C, con buen crecimiento bajo luz

continua o con alternancia de luz y oscuridad (Pană *et al.*, 2015); las colonias pueden presentar textura flocosa o granular (Owino *et al.*, 2013).



Figura 1. a) Mancha en red de la cebada con el patrón de desarrollo de la lesión tipo martillo, b) y c) presencia de clorosis y necrosis en hoja de cebada a causa de la mancha en red. Fuente: Mejía, 2017.

Este patógeno presenta un amplio rango de hospedantes que incluyen especies de poáceas silvestres de los géneros *Stipa*, *Hordeum*, *Agropyron*, *Hordelymus* y *Elymus* (Brown *et al.*, 1993) y cereales como *Avena sativa* (Shipton *et al.*, 1973) y *Triticum aestivum* (Shipton *et al.*, 1973; Tóth *et al.*, 2008).

1.1.3.1 Ciclo biológico de *Pyrenophora teres*

Este patógeno tiene dos estados de vida (Fig.2). El estado asexual (anamorfo) denominado *D. teres*, en el cual produce conidios, con un rol importante en la iniciación y diseminación de la enfermedad y el estado sexual (teleomorfo) denominado *P. teres*, asociado con la formación de pseudotecios (Kiehr *et al.*, 2016), el cual ocurre tardíamente en el verano o al inicio del otoño, que bajo condiciones ambientales propicias, conduce a la liberación de ascosporas para continuar su ciclo de vida (Piening, 1968; Shipton *et al.*, 1973).

1.1.3.1.1 Supervivencia

La identificación de la/las fuente (s) de supervivencia de un hongo fitopatógeno es un paso clave en el diseño de un control eficaz de la enfermedad, ya que puede permitir la eliminación o reducción de la/las misma (s) antes de que pueda comenzar una epidemia de la enfermedad (Waller y Cannon, 2002). La importancia epidemiológica de los patógenos necrotróficos en la semilla ha sido documentada en muchos cereales (Youcef-Benkada *et al.*, 1994; Manandhar *et al.*, 1998; Carmona *et al.*, 2001; Carmona *et al.*, 2004; Carmona *et al.*, 2006; Carmona *et al.*, 2008; Ora *et al.*, 2011). A través de la semilla infectada los patógenos pueden sobrevivir en ausencia del hospedante, ser introducidos en áreas libres de enfermedad, ingresar nuevas razas del patógeno y generar focos

primarios de infección (Reis *et al.*, 1999a). Por ejemplo, la semilla infectada con *D. teres* tiene un rol preponderante como fuente primaria de inóculo en los cultivos de cebada (Hampton, 1980; Carmona *et al.*, 2008; Nakova, 2009). El patógeno mantiene su viabilidad en el período comprendido entre la cosecha hasta la nueva siembra; en otras palabras, se mantiene vivo entre cultivos en las semillas almacenadas y sobrevive saprofiticamente en los rastrojos del cultivo, produciendo conidios o ascosporas en peritecios (Carmona *et al.*, 1996).

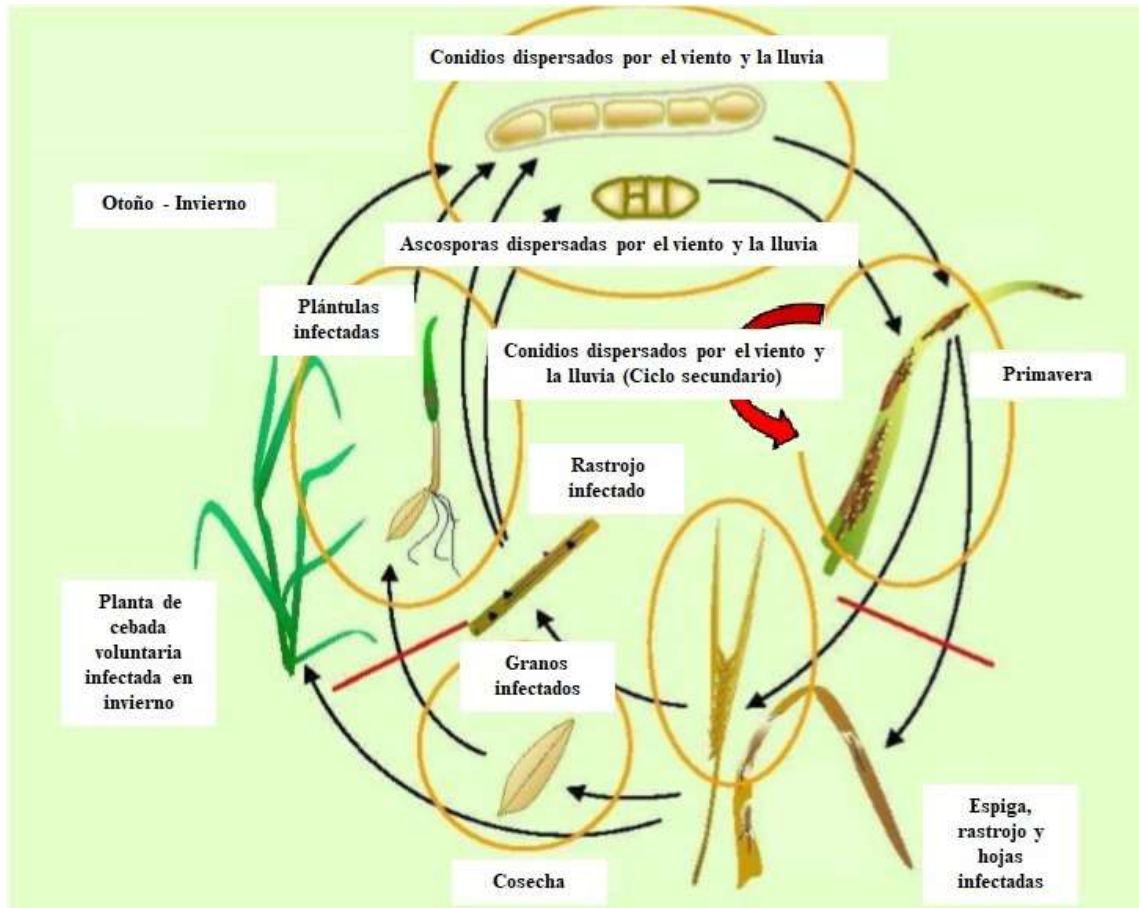


Figura 2. Ciclo de vida de *P. teres*, evidenciando las fases iniciación y dispersión de la mancha en red. Adaptado de Jorgensen *et al.* (2004).

En la semilla, el patógeno permanece en dormición debido a la baja humedad de la misma, y una vez iniciado el proceso de germinación de la cebada en el suelo, el hongo inicia su extracción de nutrientes de la semilla y su expansión micelial en la carióside (Reis, 1991).

1.1.3.1.2 Diseminación e infección del patógeno

El patógeno presente en la semilla se transmite al coleóptilo (Carmona *et al.*, 1999). Posteriormente, el patógeno coloniza el coleóptilo, terminando por penetrar la plúmula emergente. De esta manera, la plúmula al emerger de la superficie del suelo trae con ella una porción de micelio del hongo. Eventualmente, este termina por colonizar el tejido foliar, el que luego de algunos días podrá presentar una o más manchas estriadas cortas

en el limbo de la primera hoja. Con luz y humedad relativa elevada el hongo esporula en la superficie de esta lesión (Reis, 1991).

La enfermedad avanza en las plántulas con el desarrollo de las manchas en forma de red, y, a través de la producción de conidios, se infectan nuevas hojas dentro de la planta (intraplanta) y nuevas plántulas (interplanta) por la diseminación del inóculo vía viento y lluvia. Igualmente, se infectan las plántulas de cebada a través de la diseminación anemófila de los conidios presentes en los restos del cultivo (Jorgensen *et al.*, 2004). Con un corto período de latencia que varía entre 5 y 11 días (Peever y Milgroom, 1994), se desarrollan múltiples infecciones durante el ciclo ontogénico de la cebada.

1.1.3.2 Manejo de la mancha en red

1.1.3.2.1 Tratamiento de semillas

El tratamiento químico de la semilla es una estrategia fundamental de manejo de la MR (Carmona *et al.*, 2001). Existen fungicidas y dosis de muy buena eficacia de control para *D. teres* como el iprodione, iminoctadine o guazatine (Carmona *et al.*, 2001). Se trata de una de las escasas técnicas de manejo agronómico que ofrecen la posibilidad de controlar en un cien por ciento a los patógenos presentes en semillas (erradicación) (Carmona y Sautua, 2016).

1.1.3.2.2 Aplicación de fungicidas foliares

En los casos en que el nivel de resistencia genética no fuera suficiente, o bien el tratamiento de semillas y las demás prácticas culturales no redujesen el inóculo de los patógenos por debajo del umbral de daño económico, el control químico, vía pulverización de los órganos aéreos, es una medida de manejo de emergencia y de efecto rápido (Carmona *et al.*, 2008). En el cultivo de cebada, el crecimiento en la prevalencia e intensidad de manchas foliares direcciona y posiciona al uso de fungicidas como una medida clave en la protección (Carmona y Sautua, 2016). El crecimiento de las manchas foliares (escaldadura, mancha borrosa, mancha en red, ramulariosis) durante los últimos años implica una necesidad de mayor implementación de rotación, tratamiento de semilla y aplicación foliar de fungicidas de manera racional por parte de los productores de cebada. En este sentido, se recomienda la aplicación de fungicidas en base a los umbrales de acción (Carmona y Sautua, 2016).

1.1.3.2.3 Rotación de cultivos

Es recomendable efectuar la rotación con al menos un intervalo de dos años para permitir la completa degradación de los restos culturales, reducción del inóculo (rastreo y plantas voluntarias) a través de la labranza (Carmona y Sautua, 2015). Las rotaciones con colza, lino y avena resultan exitosas para el manejo de la enfermedad (Carmona, 2008b).

1.1.3.2.4 Eliminación de plantas guachas

Las plantas voluntarias (“guachas”) garantizan la supervivencia del patógeno en el verano y otoño, actuando como puentes “verdes” y comprometiendo el periodo de rotación necesario (Carmona, 2008b).

1.1.3.2.5 Resistencia varietal

El uso de cultivares susceptibles es el factor individual más significativo que afecta la pérdida de rendimiento. La mayoría de los cultivares de cebada resultan susceptibles a las manchas foliares en diversos grados. Los estudios de reacción de genotipos a la MR modificaron el panorama varietal actual de la cebada en la Argentina desplazando aquéllos que resultaron altamente susceptibles. Los ensayos de reacción de líneas experimentales de Maltería Pampa, Quilmes, INTA EEA Bordenave y el cultivar Ana mostraron la disponibilidad de materiales con reacciones de resistencia a moderada resistencia al estado de plántula y planta adulta (Ferrazzini, 1996; Barreto *et al.*, 2000).

En el país las variedades de cebada Scarlett, Shakira y Traveler presentan un mal comportamiento frente a *D. teres*, mientras que las variedades Alicia, Andreia, Explorer, Jennifer y Overture muestran un comportamiento regular y bueno, los cultivares Danielle, Montoya y MP1012 (Cattaneo, 2018b).

El cultivo de cebada en Argentina nuevamente ha pasado a sostenerse en una variedad, como pasó hace unos años con Scarlett. Hoy Andreia ocupa el 80% del área de siembra y representa más de ese porcentaje en la producción total de cebada (Cattaneo, 2019).

1.1.4 Grupos de fungicidas utilizados en el manejo de la mancha en red en la Argentina

Los fungicidas más frecuentemente utilizados en la Argentina para el control de la MR incluyen a las siguientes mezclas de principios activos: fluxapyroxad 5% + epoxiconazole 5% + piraclostrobina 8,1% (FEP), isopyrazam 12,5% + azoxistrobina 20% (IAZ), azoxistrobina 20% + cyproconazole 8% (AZC), trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5% (TP), piraclostrobina 13,3% + epoxiconazole 5% y trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5% + bixafen 12,5% (TPB) (Reis y Carmona, 2013; Carmona y Sautua, 2015).

1.1.4.1 Inhibidores de la desmetilación (IDMs)

Los fungicidas del grupo de los IDMs (inhibidores de la desmetilación, Código FRAC – Fungicide Resistance Action Committee #3, SBI Clase I) pertenecen al grupo más amplio de los inhibidores de la biosíntesis de esterol (SBI) (FRAC, 2018). Los IDMs inhiben la desmetilación de C14 dentro de la biosíntesis de esterol. Los IDMs pertenecen a diferentes grupos químicos. Además de los triazoles, numerosos imidazoles, piridinas y pirimidinas también son inhibidores de la desmetilación (FRAC, 2018). Todos los IDMs inhiben al hongo por interacción con el mismo sitio de acción, C14-desmetilasa (Codificada por el gen *erg11/cyp 51*) y son considerados a ser de resistencia cruzada entre sí (FRAC, 2018). Los primeros IDMs fueron usados en la década de los 70, triforine, triadimefon e imazalil siendo los primeros representantes de este grupo. Desde entonces aproximadamente 30 IDMs más han sido usados en agricultura (Brent y Hollomon, 2007a).

1.1.4.2 Inhibidores de la succinato deshidrogenasa (ISDHs)

Los inhibidores de la enzima succinato deshidrogenasa han sido agrupados bajo el código FRAC #7 (FRAC, 2018). La enzima objeto de control de los ISDHs es la succinato deshidrogenasa (SDH o complejo respiratorio II), la cual se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y participa en la cadena de transporte de electrones durante la respiración mitocondrial en las células de *D. teres*. Esta enzima también participa en el ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarboxílicos) (Sierotzki y Scalliet, 2013). La succinato deshidrogenasa contiene cuatro subunidades (A, B, C y D) y el sitio de ensamblaje de los ISDHs (sitio de unión de la ubiquinona) está formado por las subunidades B, C y D (FRAC, 2018). Los fungicidas del grupo ISDHs se descubrieron hace más de 40 años. Debido al limitado espectro de enfermedades y aplicaciones de las carboxamidas de “primera generación”; la resistencia bajo condiciones comerciales se limitó a unos pocos cultivos/patosistemas (principalmente Basidiomycetes), por ejemplo, *Puccinia horiana*, roya del crisantemo, y *Ustilago nuda*, carbón volador de la cebada (FRAC, 2019).

1.1.4.3 Inhibidores de la quinona externa IQe

El descubrimiento de los IQe (código FRAC #11) se inspiró en un grupo de derivados fungicidas naturales del ácido beta-metoxiacrílico, como la estrobilurina A y la oudemansina A, producida por los basidiomicetos *Strobilurus*, *Mycena* y *Oudemansiella* (Fernández - Ortuño *et al.*, 2008). Los IQe representan uno de los grupos de fungicidas más ampliamente usados para el control de hongos en la agricultura (Leadbeater, 2012). Los IQe matan a los hongos fitopatógenos bloqueando el complejo respiratorio III y la cadena de transporte de electrones, consecuentemente inhibiendo la producción de energía en la célula fúngica (Bartlett *et al.*, 2001; Bartlett *et al.*, 2002). Si bien actúan de manera similar a los ISDH, ambos grupos actúan en dos complejos enzimáticos diferentes. Los primeros miembros de los IQe fueron lanzados en 1996. Poco tiempo después se encontraron aislados de *Blumeria graminis* f sp. *tritici* (Sierotzki *et al.*, 2000) y *Plasmopara viticola* (Heaney *et al.*, 2000) resistentes a IQe. Se encontró que tenían una mutación en el gen del citocromo b que causó que la proteína cambiara de glicina a alanina en la posición 143 (G143A) (FRAC, 2019).

1.1.5 Conceptos dentro del estudio de la resistencia de hongos a fungicidas

1.1.5.1 Fungicidas

Son sustancias químicas tóxicas para los hongos, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento micelial o las esporas o directamente lo matan. Las características químicas, físicas y biológicas de un fungicida determinan su idoneidad para el control de una determinada enfermedad (Reis y Carmona, 2013).

1.1.5.2 Mutación

Es un cambio hereditario permanente de la secuencia de nucleótidos en un gen o un cromosoma (Biology Online Dictionary, 2018).

1.1.5.3 Pérdida de la sensibilidad

Ocurre cuando un hongo se vuelve parcial o totalmente insensible a un fungicida. La palabra pérdida da la idea de insensibilidad total, lo que no siempre es verdad; por eso, debe evitarse (Reis y Carmona, 2011).

1.1.5.4 Reducción de la sensibilidad

Tarde o temprano, durante los años de uso comercial de un fungicida, pueden surgir poblaciones del patógeno objeto de control que ya no son suficientemente sensibles para controlarse adecuadamente. Generalmente, la reducción de la sensibilidad surge como respuesta al uso repetido del fungicida, o al uso repetido de otro fungicida que se relaciona químicamente y/o bioquímicamente a través de un mecanismo común de acción antifúngica. La primera evidencia de esta alteración es observada por el productor, que se queja de la “falla de control”. En esa situación el control pasó de eficiente o económico a ser ineficiente y antieconómico (Reis y Carmona, 2011).

La reducción de la sensibilidad de una población de un hongo puede ser medida por el factor de sensibilidad, que refleja el grado de la alteración. Es la magnitud de la diferencia entre la CI_{50} (concentración inhibitoria necesaria para inhibir el 50% del crecimiento micelial o germinación) de la población sensible (concentración de referencia) y la CI_{50} de la población sospechosa de tener la sensibilidad alterada (Reis y Carmona, 2011).

1.1.5.5 Línea base (Del inglés: *baseline*)

Una línea base es definida como un perfil de la sensibilidad del hongo objeto de control al fungicida, construida mediante técnicas biológicas y moleculares para evaluar la respuesta de poblaciones fúngicas previamente no expuestas al fungicida (Russell, 2004).

1.1.5.6 Resistencia cruzada

Es un fenómeno que ocurre cuando la resistencia surge a un fungicida que además resulta con resistencia a otro fungicida del mismo grupo químico (FRAC, 2018). Por ejemplo, la sensibilidad de *Mycosphaerella graminicola* a cyproconazole y epoxiconazole están bien correlacionadas ($r^2 = 0,67$) (Brent y Hollomon, 2007b).

1.1.5.7 Resistencia múltiple

La resistencia múltiple se desarrolla cuando un transportador específico de un patógeno es capaz de excluir múltiples fungicidas de diferentes grupos químicos. La aplicación de los fungicidas en cuestión puede ejercer suficiente presión de selección para que los aislados que contienen estos transportadores exportadores de fungicidas se vuelvan más prevalentes en la población (FRAC, 2018). Como ejemplo puede mencionarse la ocurrencia de razas de *Botrytis cinerea* con resistencia múltiple al boscalid, piraclostrobina, fenhexamid (Pokorny *et al.*, 2016), iprodione, fludioxonil, carbendazim y cyprodinil (Kretschmer *et al.*, 2009).

1.1.6 Resistencia a fungicidas

El término es generalmente usado para identificar dentro de una población de una especie de hongo fitopatógeno sensible aquellas cepas que han adquirido, usualmente por mutación, la insensibilidad a un determinado principio activo fungicida. El crecimiento o desarrollo de la cepa del hongo resistente no es inhibida por el fungicida a concentraciones a las cuales son inhibitorias para la población originalmente salvaje o sensible (Delp y Dekker, 1985).

El desarrollo de la resistencia de los patógenos a los fungicidas ocurre en tres fases claves que son emergencia, selección y adaptación (van den Bosch *et al.*, 2011). Inicialmente la raza resistente emerge a través de la mutación e invasión, en donde la mutación se refiere a uno o más cambios hereditarios en células individuales confiriendo algún nivel de resistencia y la invasión se relaciona con un incremento en la frecuencia por selección o deriva genética (van den Bosch *et al.*, 2011). En una segunda instancia, la raza resistente está presente en la población del patógeno y la fracción de la población del patógeno con la resistencia incrementa debido a la presión de selección impuesta por el fungicida (van den Bosch *et al.*, 2011). Finalmente ocurre una fase de adaptación, en donde la fracción resistente de la población del patógeno ya es predominante, lo que fuerza a que el manejo químico del cultivo tenga que ajustarse a través de la alteración de la dosis o ingrediente activo del fungicida usado con la finalidad de mantener el control de la enfermedad (van den Bosch *et al.*, 2011).

Por otra parte, es importante definir dos tipos de resistencia a fungicida. La resistencia caracterizada por una pérdida súbita y marcada de eficacia, y por la presencia de poblaciones de patógenos sensibles y resistentes con respuestas muy diferentes. Este tipo de resistencia se denomina resistencia cualitativa. El otro tipo de resistencia está relacionado con una disminución progresiva de la sensibilidad de las poblaciones de patógenos y por lo tanto del control de la enfermedad. Este tipo de resistencia se manifiestan a campo gradualmente y en grado variable, y se denomina cuantitativa (Brent y Hollomon, 2007a).

La resistencia a campo resulta cuando la prevalencia de los aislados resistentes a fungicidas alcanza un umbral donde ya no se observa control de la enfermedad. Los principales factores que seleccionan la resistencia a fungicida en un organismo son según Beckerman (2013):

- 1) La biología del patógeno.
- 2) El mecanismo de acción del fungicida.
- 3) La tasa y frecuencia de aplicación de un determinado principio activo fungicida.

Un aspecto importante asociado al desarrollo de resistencia por parte de los patógenos es la clase o grupo químico al que pertenecen los fungicidas. Existen moléculas a base de cobre y ditiocarbamatos de acción multisitio, es decir, que poseen múltiples sitios de acción en la célula fúngica, para las que rara vez se ha observado resistencia a pesar de los años de uso (Brent y Hollomon, 2007b). En el caso opuesto, existen moléculas unisitio, que actúan en una enzima específica de una ruta metabólica específica dentro de la célula fúngica, para las que se han reportado casos de resistencia luego de ser usadas en pocas campañas agrícolas.

1.1.7 Estudios de sensibilidad a fungicidas y mutaciones de *D. teres*

1.1.7.1 IDMs

La resistencia a los IDMs está asociada a uno o varios de los siguientes mecanismos: a) modificación del sitio de acción en la enzima del hongo codificada por el gen *cyp51* (Mair *et al.*, 2016), b) la sobreexpresión de tal gen, c) incremento del eflujo del fungicida por sobreexpresión de transportadores unidos a la membrana (Ishii y Hollomon, 2015).

En aislados de *D. teres* se ha estudiado la resistencia a los IDMs y la genética del patógeno frente a los fungicidas en el cultivo de cebada. Peever y Milgroom (1994) demostraron en ensayos de sensibilidad a los fungicidas triazoles, la variabilidad genética de los aislados de *D. teres* al propiconazole y triadimenol. De igual forma, Locke (2000) evidenció la disminución de la sensibilidad de aislados de *D. teres* al propiconazole y procloraz en el periodo 1988 - 1999. Akhavan *et al.* (2017a), utilizando dosis discriminatorias *in vitro*, evidenciaron la insensibilidad de dos aislados de *D. teres* al propiconazole. Igualmente, Campbell y Crous (2002) demostraron la baja sensibilidad de aislados de *D. teres* a triadimenol, una de las moléculas de mayor tiempo en el mercado. Asimismo, en Brasil y Argentina se demostró la existencia de variabilidad entre las cepas de ambos países al triadimenol (Reis *et al.*, 1997); registrando una mayor sensibilidad las cepas de Argentina con respecto a las de Brasil. Sin embargo, la variabilidad entre las cepas de ambos países puede deberse a que en Brasil se utilizó el triadimenol para tratamiento de semillas desde 1986, es decir en mayor cantidad y frecuencia que en Argentina.

1.1.7.2 IQe

En relación con los fungicidas de este grupo y su toxicidad a cepas de *D. teres*, se han informado muchos estudios realizados *in vitro* e *in vivo*. Por un lado, Jayasena *et al.* (2002) evidenciaron que el ingrediente activo pyraclostrobina fue uno de los más efectivos en el control de la MR en condiciones de campo; mejorando el rendimiento y la calidad del grano. Por otro lado, Akhavan *et al.* (2017a) registraron la presencia de un aislado de *D. teres* insensible a pyraclostrobina en Canadá.

Las mutaciones que se generan en el gen *cyt b* y que confieren resistencia a los IQe incluyen sustituciones de aminoácidos como glicina por alanina en la posición 143 (G143A), fenilalanina por leucina en la posición 129 (F129L) y glicina por arginina en la posición 137 (G137R) (FRAC, 2018). En *D. teres* la mutación asociada a la resistencia a los IQe es la mutación F129L (Sierotzki *et al.*, 2007). En Inglaterra Marzani *et al.* (2013) demostraron que el fungicida pyraclostrobina fue el más efectivo en la inhibición del crecimiento de los aislados de tipo salvaje y los de la mutación F129L en *D. teres*. Sin embargo, en los ensayos efectuados a campo se detectó que este fungicida presentó fallas en el control de la enfermedad en las plantas de cebada que fueron inoculadas con las cepas mutantes, mientras que en las plantas inoculadas con aislados de tipo salvaje (sensibles) se observó un control efectivo. En contraste, Semar *et al.* (2007) en Francia evidenciaron que todas las dosis de pyraclostrobina controlaron la MR a campo en todos los niveles de frecuencia de la mutación F129L (0 - 100% de frecuencia).

1.1.7.3 ISDHs

Numerosos casos de resistencia a los inhibidores de la succinato deshidrogenasa han sido informados en el cultivo de cebada para *D. teres* con las mutaciones en las subunidades de la succinato deshidrogenasa. Algunos ejemplos de mutaciones de la enzima succinato deshidrogenasa se informaron en la subunidad B (B - H277Y; sustitución de histidina por tirosina en la posición del aminoácido 277), subunidad C (C - G79R; sustitución de glicina por arginina) y en la subunidad D (D - H134R; sustitución de histidina por arginina) en *D. teres* (Stammler, 2014a).

1.1.8 Sensibilidad *in vitro* en otros hongos fitopatógenos

La sensibilidad de los hongos a los fungicidas se ha estudiado en otros patosistemas de cereales como en *Drechslera tritici-repentis* agente causal de la mancha amarilla del trigo (Hunger y Brown 1987; Stolte, 2006; Beard *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2012; Tonin *et al.*, 2015), la roya de la hoja del trigo por *Puccinia triticina* (Stammler *et al.*, 2009), fusariosis del trigo por *Gibberella zeae* (Klix *et al.*, 2007; Spolti *et al.*, 2014), el tizón de la hoja del arroz ocasionado por *Pyricularia oryzae* (Taga *et al.*, 1982; Suzuki *et al.*, 2010), el tizón de la hoja del maíz del norte y sur ocasionada por *Exserohilum turcicum* (De Rossi *et al.*, 2015a; Weems y Bradley, 2017) y *Bipolaris maydis* (Han *et al.*, 2017), respectivamente. Además, en otras enfermedades que ocasionan pérdidas económicas de los cultivos como la pudrición carbonosa de la raíz del algodón por *Macrophomina phaseolina* (Mahmoud *et al.*, 2006), el tizón de la vaina del arroz por *Rhizoctonia solani* (Chen *et al.*, 2012), enfermedades de las plántulas de soja (pudrición de raíces y del hipocotilo, muerte de plántulas en pre y post emergencia) por *R. solani* (Olutoyosi *et al.*, 2016), el tizón temprano de la papa por *Alternaria solani* (Pasche *et al.*, 2004), la mancha anillada de la soja por *Corynespora cassiicola* (Avozani, 2011), enfermedades de fin de ciclo de la soja (Carmona *et al.*, 2017), en la roya asiática de la soja por *Phakopsora pachyrhizi* (Schmitz *et al.*, 2013; Xavier *et al.*, 2015; Twizeyimana y Hartman, 2017), especies del género *Colletotrichum* que ocasionan antracnosis en diferentes frutales (Ishii *et al.*, 2016), marchitez de la sandía ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (Petkar *et al.*, 2017), el mildiu (*Plasmopara viticola*) y el oidio (*Erysiphe necator*) de la vid (Colcol y Baudoin, 2016), entre otros.

1.1.9 Contexto actual del monitoreo de la sensibilidad de *D. teres* a fungicidas en la Argentina

Las aplicaciones de fungicida prolongan la resistencia genética de un cultivar a través de la disminución de las tasas de crecimiento epidemiológico de las razas virulentas y avirulentas del patógeno (Carolan *et al.*, 2017), y reducen la incidencia y severidad de las enfermedades (Mahapatra y Das 2013; Kumar *et al.*, 2014). Sin embargo, el mal uso de estos productos fitosanitarios, sin respetar las buenas prácticas agrícolas, puede generar un efecto negativo debido a que los patógenos pueden desarrollar resistencia cuando se realizan aplicaciones químicas sin criterio técnico (Carmona y Sautua, 2017). Esta problemática no solo afecta la producción de alimentos sino también el manejo integrado de las enfermedades, ya que como consecuencia los productores terminan usando altas dosis y/o una mayor frecuencia de aplicaciones, o subdividen las dosis recomendadas, lo que a su vez promueve mayores fallas en el control químico a campo (Ishii, 2006).

La determinación de la sensibilidad a un fungicida particular en una población de patógenos es el primer paso en el manejo de la resistencia a los fungicidas. El reconocimiento del surgimiento de resistencia en el campo puede ser realizado por la comparación de datos entre poblaciones de hongos resistentes y sensibles (Georgopoulos, 1982). La sensibilidad de un hongo a un fungicida, así como la fungitoxicidad de una sustancia química, se mide a través de la concentración inhibitoria (CI_{50}) en mg/l o ppm. Si la CI_{50} se alterase en el tiempo hacia valores mayores con el uso repetido de un fungicida en una misma región buscando el control de un patógeno dado, podría indicar que está ocurriendo selección de ese hongo objeto de control en la dirección hacia la insensibilidad a aquella sustancia química (Reis *et al.*, 2010).

Por lo tanto, el monitoreo de la sensibilidad a fungicidas, en una población de patógenos, es importante para determinar la presencia de cepas resistentes o de sensibilidad reducida, de manera de poder mantener la eficacia del control químico. La sensibilidad de un hongo a un fungicida debería determinarse antes de su uso comercial, sin embargo, en general esto no es realizado, ni se tiene certeza que se realizará en un futuro (Hollomon, 2015). La vida comercial útil o efectiva de un fungicida se define como el tiempo que va desde el inicio de uso en un cultivo en una región determinada cuando se lanza al mercado, hasta que pierde el control efectivo de la enfermedad que se pretende controlar (Hobbelen *et al.*, 2013). El surgimiento de resistencia o cambios en la sensibilidad a los diferentes principios activos fungicidas en los diferentes hongos agentes causales de enfermedades es actualmente uno de los aspectos más importantes de la agricultura moderna (Deising *et al.*, 2008; Hollomon, 2015; Lucas *et al.*, 2015).

Es así que, el monitoreo de los cambios en la sensibilidad a los fungicidas se convierte en un reto para organismos estatales encargados de la vigilancia y control de las enfermedades de los cultivos en Argentina. Actualmente en este país no hay estudios ni publicaciones relacionados con la sensibilidad de *D. teres* a los fungicidas de mayor uso para el manejo de la MR.

En la provincia de Buenos Aires existen dos zonas diferentes en cuanto al uso de fungicidas, la sur con mayor presión de manchas foliares y la norte, con menor intensidad de ataque, y menor superficie de siembra de cebada. De esta manera el uso y frecuencia de fungicidas es mayor en la zona sur (tres aplicaciones promedio), respecto de la zona norte (1 - 2 aplicaciones promedio).

Uno de los primeros indicios del posible cambio poblacional de la sensibilidad de un patógeno a los fungicidas, son las fallas de control a campo de ciertas moléculas. Si bien estas fallas de control no han sido investigadas en Argentina, los comentarios de fallas de control entre los productores y asesores son cada vez más frecuentes. Por ello, se propone efectuar este estudio para obtener estudios básicos de sensibilidad de *D. teres* a los fungicidas más frecuentemente utilizados y generar información útil en los programas futuros de monitoreo de la sensibilidad de los patógenos del cultivo de la cebada. Por tanto, este sería el primer estudio de fungitoxicidad de las moléculas de mayor uso para el control de la MR y del estado de la sensibilidad a los fungicidas de los aislados de *D. teres* en Argentina.

1.2 OBJETIVOS

- 1) Obtener cinco aislados de *D. teres* de la zona norte y cinco de la zona sur de producción de cebada de la Argentina a partir de semillas de cebada y evaluar la incidencia de *D. teres* en la semilla.
- 2) Caracterizar morfológicamente los aislados de *D. teres* obtenidos de semillas de cebada de distintas localidades de producción de cebada de la Argentina.
- 3) Establecer el perfil de sensibilidad *in vitro* de los aislados de *D. teres* obtenidos, a los principios activos fungicidas de las mezclas comerciales más utilizados en Argentina para el cultivo de cebada, que contengan IQe, ISDHs, IDMs, determinando la CI_{50} para cada mezcla.
- 4) Realizar una clasificación de la potencia de los fungicidas más frecuentemente usados en el cultivo de cebada para los diferentes aislados testeados.
- 5) Evaluar *in vivo* la sensibilidad a la aplicación del fungicida con menor CI_{50} a los aislados de *D. teres* que hayan resultado más y menos sensibles en la prueba *in vitro*.

1.3 HIPÓTESIS

- 1) Los principios activos fungicidas (IQe, ISDHs, IDMs) en mezclas comerciales, que normalmente se utilizan en el cultivo de cebada en la Argentina, no presentan CI_{50} *in vitro* diferente entre sí para cada uno de los diferentes aislados de *D. teres*.
- 2) La sensibilidad *in vitro* de los diferentes aislados de *D. teres* a los fungicidas en mezclas que contenga IDMs, ISDHs e IQe, no varía en función de la procedencia geográfica de los aislados.
- 3) La sensibilidad *in vitro* de los diferentes aislados de *D. teres* es variable en función de las distintas concentraciones de fungicidas utilizados.
- 4) Es posible clasificar los aislados de *D. teres* según su diferente sensibilidad a los fungicidas.
- 5) Los aislados de *D. teres* de menor y mayor sensibilidad *in vitro* al fungicida más fungitóxico también presentan baja y alta sensibilidad *in vivo*, respectivamente.

Capítulo II

Aislados de *Drechslera teres*

2. 1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Métodos de detección de los patógenos en la semilla

Se han desarrollado numerosos métodos de detección de hongos en la semilla (Nameth, 1998). Los métodos de detección reportados en la literatura incluyen la inspección directa de los patógenos en la semilla, incubación sobre medios de cultivo, tinción, incubación de semillas sobre papel secante (restricción hídrica, congelamiento, adición de herbicida) con todas las variantes (Limonard, 1966; Marcinkowska, 2002; Tylkowska *et al.*, 2015), incubación de semillas sobre papel filtro humedecido en placas de Petri con congelamiento (Jorgensen, 1983), incubación de semillas sobre toalla de papel enrollada (Warham, 1990), ensayos inmunológicos y métodos moleculares (Tsedaley, 2015).

Chidambaram *et al.* (1973), utilizaron los métodos de detección: papel filtro estándar, papel filtro con congelamiento y medio de cultivo (agar papa dextrosa) para la identificación de 25 especies del género *Drechslera* sobre semillas de diferentes cultivos. Igualmente, el método de detección por congelamiento profundo (del inglés: *Deep freezing*) desarrollado por Jorgensen (1983) también fue usado para estudios de los patógenos de este género por Carmona *et al.* (1999), Carmona *et al.* (2004) y Carmona *et al.* (2006).

El objetivo de este estudio fue obtener a partir de semillas cinco aislados de *D. teres* de la zona norte y cinco de la zona sur de producción de cebada de Argentina además, de evaluar la incidencia del patógeno en cada una de las muestras.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Origen de las muestras

Muestras de semillas de cebada de las campañas agrícolas 2000/2001, 2007/2008, 2008/2009, 2013/2014 y 2015/2016, provenientes de diferentes localidades de la provincia de Buenos Aires principalmente, y de las provincias de Entre Ríos y La Pampa, fueron analizadas en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina (FAUBA). La muestra de semilla de la campaña agrícola 2000/2001 (denominada FT), fue proporcionada por la Cátedra de Fitopatología de la FAUBA y el resto por la Cooperativa Agrícola Ganadera Limitada de Ascensión, Cervecería y Maltería Quilmes, Cooperativa Defensa de Agricultores y Fidel Cortese (Ing. Agr, consultor privado). Las muestras provenientes de campo se acondicionaron y se identificaron según el origen, variedad, campaña agrícola, etc. (Tabla 1, Fig. 3).

2.2.2 Aislamiento de *Drechslera teres* a partir de semillas de cebada

En el laboratorio se procedió a aislar al patógeno mediante la siembra de las semillas sobre papel filtro (Jorgensen, 1983). Se efectuaron 4 repeticiones de 25 semillas por cada muestra (combinación campo/variedad), es decir un total de 100 semillas por muestra. Las semillas fueron colocadas durante 24 horas a 20°C en placas de Petri descartables (conteniendo tres discos de papel de filtro humedecidos con agua destilada estéril). Seguidamente, las muestras se colocaron a -20°C durante 24 horas. Posteriormente, las semillas se incubaron por 5 - 7 días bajo ciclos de 12 horas de luz cercana a UV y 12 horas de oscuridad a 24°C. Para la muestra FT se utilizó un método de incubación de semillas adicional debido a la pobre esporulación observada con el método *Deep freezing*, que incluyó la incubación de 10 semillas (con previa desinfección con hipoclorito de sodio 1%) de cebada por cada caja de Petri (9 cm) con agar papa glucosado comercial (APGc, Britania) a 24°C bajo ciclos de 12 horas de luz cercana a la UV y 12 horas de oscuridad durante 7 días.

Previo a la obtención de los cultivos puros, se hizo una identificación del patógeno en la semilla mediante la observación de preparados microscópicos de conidios, conidióforos y fragmentos de micelio según las características morfológicas de *D. teres* por Chidambaram *et al.* (1973). Seguidamente, bajo cámara de flujo laminar (Telstar AH-100) se transportaron de 3 - 5 conidios por cada muestra a una caja de Petri con APGc. Posteriormente, los aislados puros fueron subcultivados sobre APGc.

2.2.2.1 Incidencia y prevalencia de *D. teres*

Una vez cumplido el tiempo de incubación de las semillas, se procedió a determinar la incidencia (%) con la ayuda de un microscopio estereoscópico, considerando como semilla infectada la que presentaba conidióforos con conidios de *D. teres*. La incidencia o porcentaje de infección de *D. teres* por muestra se determinó a partir de 100 semillas de cebada. La prevalencia (%) se calculó como el porcentaje de muestras de semillas infectadas con *D. teres* sobre un total de 40 muestras.

Tabla 1. Muestras de semillas de cebada según número, código (denominación), variedad, origen y campaña agrícola.

No	Muestra	Localidad	Variedad	Región	Campaña
1	1T	Cascallares, Buenos Aires	Andreia	S	2015/2016
2	2T	Cascallares, Buenos Aires	Shakira	S	2015/2016
3	3T	Bragado, Buenos Aires	Traveler	N	2015/2016
4	4T	Bragado, Buenos Aires	Traveler	N	2015/2016
5	5T	Bragado, Buenos Aires	Traveler	N	2015/2016
6	6T	La Colina, Buenos Aires	MP 1012	S	2015/2016
7	7T	Claromecó, Buenos Aires	Andreia	S	2015/2016
8	8T	Salliqueló, Buenos Aires	Andreia	S	2015/2016
9	9T	Huanguelen, Buenos Aires	Danielle	SO	2015/2016
10	10T	Huanguelen, Buenos Aires	Andreia	SO	2015/2016
11	11T	Saavedra, Buenos Aires	Danielle	SO	2015/2016
12	13T	Cnel. Suarez, Buenos Aires	Andreia	S	2015/2016
13	14T	Tres Arroyos, Buenos Aires	Andreia	S	2015/2016
14	15T	Aparicio, Buenos Aires	Andreia	S	2015/2016
15	17T	Chillar, Buenos Aires	Shakira	S	2015/2016
16	18T	Miramar, Buenos Aires	Shakira	S	2015/2016
17	19T	Miramar, Buenos Aires	Traveler	S	2015/2016
18	21T	Miramar, Buenos Aires	Explore	S	2015/2016
19	23T	Bigand, Buenos Aires	Sylphide	N	2015/2016
20	27T	Pergamino, Buenos Aires	Traveler	N	2015/2016
21	29T	Henderson, Buenos Aires	Traveler	SO	2015/2016
22	31T	Coronel Dorrego, Buenos Aires	C74	S	2015/2016
23	33T	Claromecó, Buenos Aires	Overture	S	2015/2016
24	20T	Miramar, Buenos Aires	Andreia	S	2015/2016
25	16T	Bragado, Buenos Aires	Scarlett	SO	2007/2008
26	22T	Miramar, Buenos Aires	Shakira	S	2015/2016
27	32T	San Cayetano, Buenos Aires	Andreia	S	2015/2016
28	36T	Victoria, Entre Ríos	Andreia	N	2015/2016
29	24T	San Pedro, Buenos Aires	Scarlett	N	2015/2016
30	BT	Carlos Casares, Buenos Aires	Scarlett	SO	2013/2014
31	DT	San Pedro, Buenos Aires	Scarlett	N	2008/2009
32	30T	Chacabuco, Buenos Aires	Traveler	N	2015/2016
33	40T	Dorrego, Buenos Aires	Andreia	S	2015/2016
34	25T	Arribeños, Buenos Aires	Traveler	N	2015/2016
35	12T	Gral. Pico, La Pampa	MP2121	SO	2015/2016
36	JT	Colón, Buenos Aires	Scarlett	N	2015/2016
37	UT	FAUBA (Campo experimental)	Q. Carisma	N	2015/2016
38	ST	FAUBA (Campo experimental)	Abi Balster	N	2015/2016
39	FT	Coronel Suárez, Buenos Aires	Scarlett	S	2000/2001
40	LT	Ascensión, Buenos Aires	Traveler	N	2015/2016

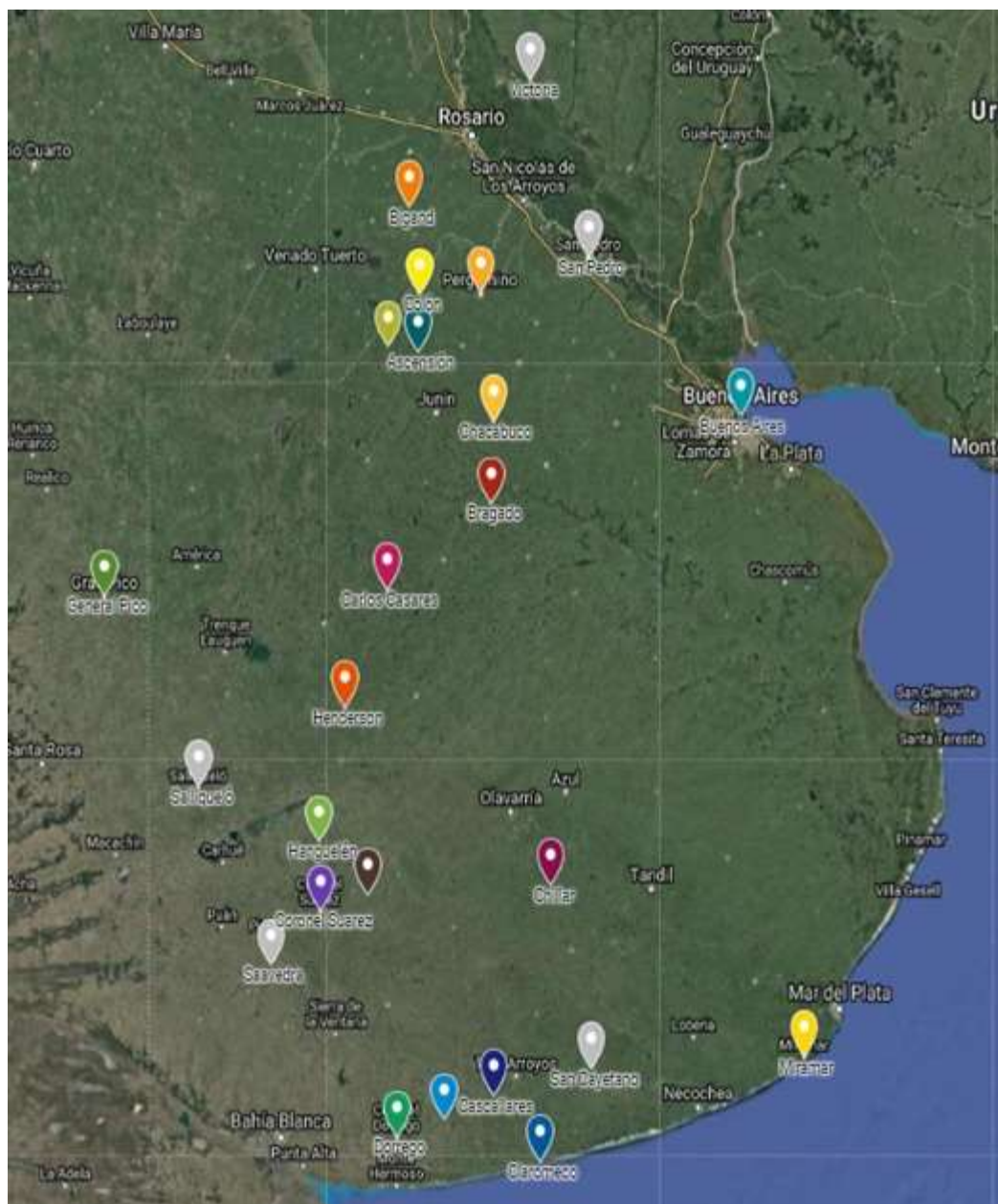


Figura 3. Localidades de la provincia de Buenos Aires, La Pampa y Entre Ríos, origen de las muestras de semillas de cebada. Fuente: Google Maps (2018).

2.2.3 Preparación de medio de cultivo

El medio de cultivo APGc fue preparado con agua destilada (AD) y esterilizado con autoclave a 121°C durante 17 minutos.

2.2.4 Mantenimiento de los aislados

Los cultivos puros fueron transferidos a tubos de vidrio con APGc en forma inclinada y dejando la tapa de los tubos ligeramente suelta. Transcurridos 10 días a 20°C, las tapas de los tubos se ajustaron y luego se almacenaron los aislados a 4°C. Para evitar la contaminación por bacterias, se adicionó al medio APGc estreptomycin (133mg L⁻¹) (Marzani, 2011).

2.3 RESULTADOS

A partir de 40 muestras de semillas de cebada, se obtuvieron 17 aislados de *D. teres* (proveniente de muestras con incidencia promedio de *D. teres* mayor o igual a 1%). La incidencia varió entre 0 a 25%, con media de 3,1% (Fig. 4) y la prevalencia de *D. teres* en las muestras de semilla fue del 42% (Fig. 5). Durante el aislamiento, se observó la presencia en semillas de otros hongos como *Bipolaris sorokiniana*, *Drechslera spp*, *Fusarium spp*, *Cladosporium spp*. y, *Alternaria spp*.

Sobre el pericarpio los conidióforos se observaron de color marrón oscuro, rectos, emergiendo individualmente con conidios cilíndricos con septo visible de coloración más clara que los conidióforos, según la descripción morfológica de Chidambaram *et al.* (1973) (Fig. 6).

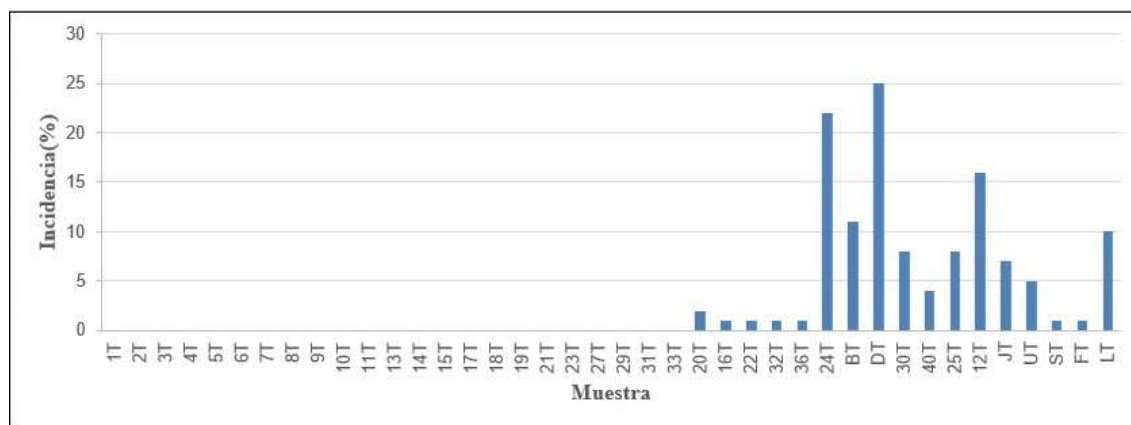


Figura 4. Incidencia (%) de *D. teres* en muestras de semillas de cebada provenientes de diferentes localidades y campañas agrícolas.

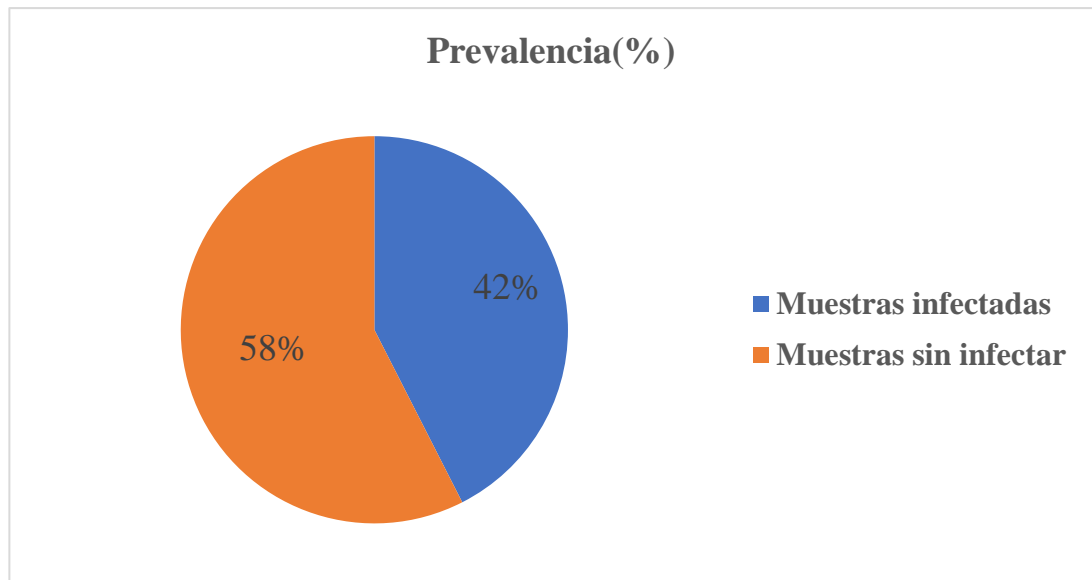


Figura 5. Prevalencia de *D. teres* en muestras de semillas de cebada.

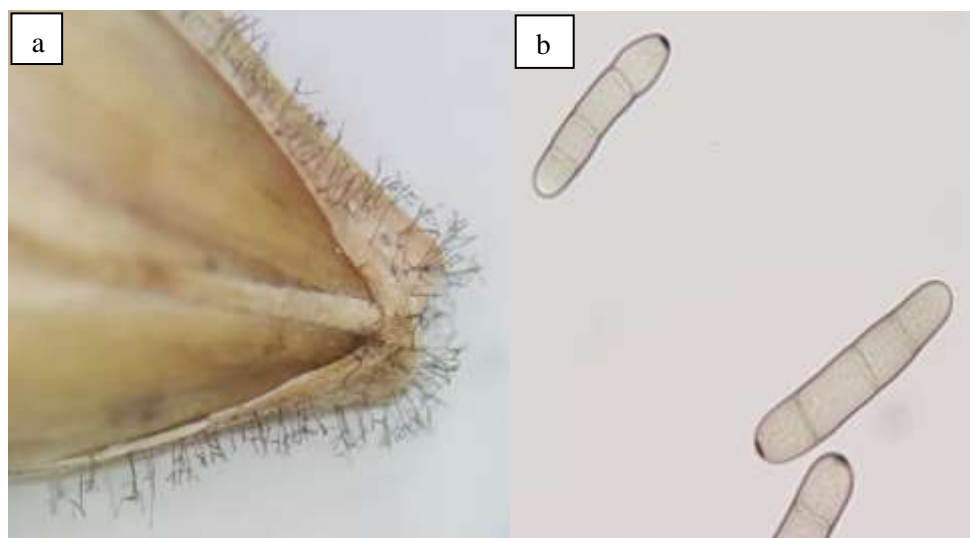


Figura 6. a) Semilla de cebada con esporulación de *D. teres* b) Conidios de *D. teres* de color marrón (40X).

2.4 DISCUSION

Las observaciones de asociación del patógeno con la semilla con los métodos de laboratorio de rutina son importantes para ubicar los lotes de semilla infectada (Baker, 1972) y para manejar las enfermedades de los cultivos (Ora *et al.*, 2011). *D. teres* presenta una asociación con la semilla, lo cual se traduce en el mecanismo de supervivencia más evolucionado, eficaz y seguro para garantizar la continuidad del ciclo de vida entre cosechas (Reis, 1991; Carmona *et al.*, 2008; Hysing y Wiik, 2013).

La obtención de los aislados resultó fácil a partir de la esporulación de *D. teres* sobre las semillas de cebada después de la incubación con el método congelamiento profundo. Además, otro aspecto relevante fue la supresión de la germinación de la semilla a través del congelamiento (Marcinkowska, 2002). El congelamiento provoca la muerte del embrión sin afectar los hongos fitopatógenos y con la ventaja de facilitar la observación de los microorganismos bajo lupa.

Las semillas muertas proveen de sustrato para el desarrollo de hongos de los géneros como *Fusarium*, *Bipolaris*, *Drechslera* y *Septoria* (Neergard, 1977).

El valor medio de la incidencia de *D. teres* en las muestras de semillas de cebada fue 3,1% mientras que Carmona *et al.* (2008) registraron un valor medio de infección de 68,75% en semillas del cv Quilmes Pampa proveniente de campos severamente afectados con MR. En este relevamiento, los valores de incidencia variaron entre 0 - 25% según las campañas agrícolas evaluadas. Los resultados de incidencia de *D. teres* en semilla confirman que este patógeno es prevalente en los campos de cebada de la Argentina.

En la muestra FT, en un primer intento, la pobre esporulación y la carga de otros microorganismos presentes, dificultó el aislamiento de *D. teres*. Sin embargo, en un segundo intento, el aislado FT se obtuvo sobre medio de cultivo APGc con previa desinfección de la semilla con hipoclorito al 1%. Por otro lado, Temple (1970) reportó que el rápido crecimiento de hongos saprofíticos como *Aspergillus* o *Cladosporium spp.*, adhiriéndose a la superficie de la semilla se vuelve problemático especialmente en detección de hongos de crecimiento lento. García *et al.* (2008), hallaron que la detección de *F. graminearum* en la semilla de trigo, puede ser afectada por la alta incidencia de hongos saprofitos, como *Epicoccum spp.* y *Cladosporium spp.*, debido a que estos organismos compiten con el patógeno por la superficie del sustrato a ser colonizada, el alimento y la humedad del aire. De igual forma, la sensibilidad del medio de cultivo para detectar a *Bipolaris sorokiniana* puede ser menor con la presencia de contaminantes de crecimiento rápido como *Trichoderma spp.*, *Rhizopus spp.*, y *Fusarium spp.* (Barba *et al.*, 2002).

Por otro lado, el método de congelamiento profundo no utilizó moléculas químicas que comprometieran la sensibilidad de los aislados de *D. teres* a los fungicidas, por ejemplo, medios selectivos modificados con antibióticos, herbicidas y fungicidas. Por ejemplo, la detección de hongos dematiáceos con el medio selectivo de Reis (Reis, 1983), contiene antibióticos (estreptomina y neomicina), y fungicidas (benomil, botran y captan). Barba *et al.* (2002) en un ensayo de comparación de métodos de detección de *B. sorokiniana* en semillas de cebada, observaron que el método que incluyó papel filtro + medio selectivo de Reis presentó un bajo nivel de esporulación, morfología de los conidios alterada (más fusiformes) y coloración menos oscura (ligeramente hialinos), dificultando la identificación del hongo y posiblemente la cuantificación en la semilla, probablemente debido a los fungicidas y antibióticos utilizados en los medios de cultivo.

Barba *et al.* (2002) registraron que la incidencia de *B. sorokiniana* en semillas de cebada fue afectada por el congelamiento de la semilla, registrando mayores niveles de incidencia en los métodos de detección que no incluyeron congelamiento. Adicionalmente los métodos con papel filtro (sin y con congelamiento) resultaron ser estadísticamente inferiores en la detección de *B. sorokiniana* en comparación con el método selectivo de Reis (con y sin congelamiento). Por el contrario, estos mismos autores reportaron que la detección de *B. sorokiniana* en semillas de trigo no difirió significativamente entre los

métodos con papel filtro (sin y con congelamiento) y medio selectivo de Reis (con y sin congelamiento). En este relevamiento de muestras de cebada, una posible explicación a la nula detección de *D. teres* en el 62,1 % de las muestras de la campaña agrícola 2015/2016 pudo ser debida a la baja sensibilidad del método de congelamiento profundo. Sin embargo, es una hipótesis que debe ser probada a través de la comparación de distintos métodos de detección de *D. teres* en muestras de semillas de campos de cebada de la Argentina. Reis *et al.* (1999b) mostraron que *D. teres* presentó una mayor esporulación sobre el medio selectivo de Reis, agar extracto de tomate y agar extracto de malta. Carmona *et al.* (2006) demostraron una mayor sensibilidad de métodos con medios de cultivo para la detección de *Drechslera tritici-repentis* en comparación con el método congelamiento profundo. En suma, se observó una mayor esporulación visual de *D. tritici-repentis* sobre agar poroto lima y medio selectivo para *Cochliobolus sativus* con respecto al método congelamiento profundo. Figueiró y Reis (2009) evidenciaron que el método más sensible en la detección de *Drechslera avenae* fue el medio semiselectivo de Reis (Reis, 1983) tanto para avena blanca como para avena negra, registrando una mayor incidencia de este patógeno en semillas de avena blanca y negra de 76 y 90% en los municipios Passo Fundo y San José del Oro, respectivamente. Adicionalmente el método de papel filtro con congelamiento no presentó diferencias significativas en los valores de incidencia de *F. graminearum* con un medio semiselectivo para *Fusarium* (García *et al.*, 2008).

2.5 CONCLUSIONES

Los resultados evidencian que:

- Drechslera teres* es un patógeno prevalente en los campos de cebada de la Argentina por lo cual se logra un total de 17 aislados procedentes de las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos y La Pampa.
- El método de detección de patógenos en semilla por congelamiento profundo permite el aislamiento de cepas de *D. teres* y puede ser usado en forma rutinaria y con éxito para detectar *D. teres* en semillas de cebada.

Capítulo III

Morfología de los aislados de *Drechslera teres*

3.1 INTRODUCCIÓN

D. teres (Sacc.) Shoemaker, pertenece a la División Ascomycota, Subdivisión Pezizomycotina, Clase Dothideomycetes, Subclase Pleosporomycetidae, Orden Pleosporales, Familia Pleosporaceae y género *Drechslera* (Mycobank, 2018).

Este patógeno produce un gran número de conidios, que nacen en la parte superior de los conidióforos, son ligeramente hinchados en la base y usualmente emergen solos o en grupos de dos o tres. Los conidios presentan dimensiones de 30 - 174 μm x 15 - 23 μm , lisos, cilíndricos y rectos, redondos en ambos extremos, subhialinos a marrón amarillento y a menudo, con cuatro a seis pseudoseptos (Mathre, 1997). Igualmente, Chidambaram *et al.* (1973) registraron conidios con dimensiones de 32,3 – 122,4 x 11,9 – 20,4 μm y con un número de dos – siete septos y según Shipton *et al.* (1973) el tamaño de los conidios es variable. Los rangos de longitud mínima de 15 a 100 μm y la longitud máxima de 80 a 300 μm . Los conidios pueden presentar una cicatriz (Chidambaram *et al.*, 1973) conspicua o poco visible en los dos extremos redondeados (Owino *et al.*, 2013) (Fig. 7).

D. teres también presenta un estado picnidal (Carmona *et al.*, 1996). Los picnidios son de forma globosa a pera, de color amarillo a marrón, con 64 – 172 μm en diámetro, y producen picnidiosporas hialinas no septadas, esféricas y elipsoidales que miden 1,0 – 1,9 μm x 1,4 – 3,2 μm (Smedegaard – Petersen, 1972; Mathre, 1997).

En la Argentina no existe información actualizada de la morfología de los conidios de *D. teres*. El objetivo de este trabajo fue caracterizar morfológicamente los aislados de *D. teres* obtenidos de semillas de cebada de distintas localidades de Argentina a través del cultivo de estas cepas sobre diferentes medios de cultivo.

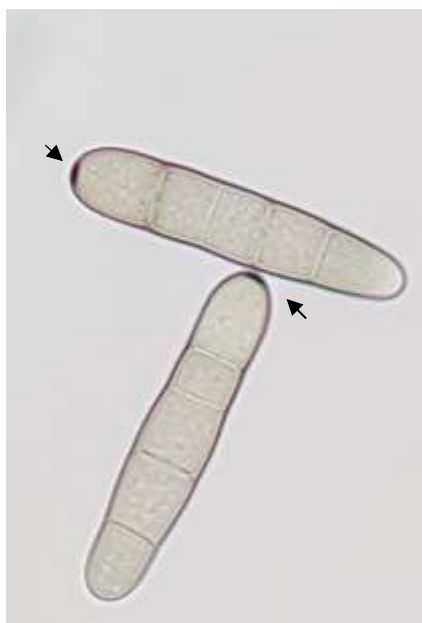


Figura 7. Conidios de *D. teres* con cicatriz visible en el extremo redondeado, punto de unión al conidióforo (flecha negra).

3.2 METODOLOGÍA

La medición de los conidios de los aislados de *D. teres* se efectuó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

3.2.1 Preparación de medio de cultivos

Todos los medios de cultivos fueron preparados con agua destilada (AD) y autoclavados a 121°C durante 20 min.

3.2.1.1 Medio V8 - 20% y V8 - 10%

El medio V8 - 20% se preparó a partir de 200 ml de jugo V8 (Campbell Soup Company), 3,0 g CaCO₃, 20 g de agar y AD hasta alcanzar el volumen de 1 L en un matraz aforado (Gilchrist *et al.*, 2005). El medio V8 - 10 % se preparó igual que el medio V8 - 20%, pero con un volumen de jugo V8 de 100 mL.

3.2.1.2 Agar papa glucosado (APG)

En un Erlenmeyer se colocaron 200 g de papa más 800 mL de agua y se llevó a microonda por 8 min (hasta que la papa se ablande); posteriormente se filtró la infusión de papa con un colador de tela y se le adicionaron 20 g de dextrosa y 20 g de agar, se agitó hasta eliminar los grumos y se completó con AD hasta alcanzar el volumen de 1 L.

3.2.1.3 Medio extracto de tomate triple (ETT)

Se pesaron 20 g de extracto de tomate triple (La Campagnola), 4,5 g de CaCO₃ y 20 g de agar. Luego, se adicionó el agar y el extracto de tomate triple en un Erlenmeyer con 200 mL de AD, la solución se llevó a microonda durante 5 min, se agitó con una varilla de vidrio y posteriormente se llevó al volumen de 1 L con AD.

3.2.1.4 Puré de tomate (PT)

Se adicionaron 200 mL de puré de tomate (La Campagnola), 20 g de agar, 4,5 g de CaCO₃ y 200 ml de AD; la solución se agitó durante 5 min y luego se llevó al volumen de 1 L con AD.

3.2.1.5 Concentrado de tomate 10 % (CT-10%) y 5% (CT-5%)

Se adicionó 100 ml de concentrado de tomate (concentración: 100%; Campbell Soup Company), 20 g de agar, 3 g de CaCO₃ y AD hasta alcanzar el volumen de 1 L. La solución se agitó con una varilla de vidrio durante 5 min. El medio concentrado de tomate 5% (CT - 5%) se preparó como se mencionó anteriormente, pero con la adición de 50 ml de concentrado de tomate.

3.2.1.6 Agar poroto lima (APL)

Se pesaron 8 g de poroto lima y 20 g de agar. El poroto lima se agregó a 500 mL de agua y se llevó a microonda durante 15 min. Seguidamente, se filtró la infusión de poroto, se adicionó el agar, se agitó con una varilla de vidrio y se llevó a volumen de 1 L con AD.

3.2.1.7 Agar poroto mung (APM)

Se pesaron 8 g de poroto mung y 20 g de agar. Se adicionó el poroto mung a 500 mL de agua y se llevó a microonda durante 15 min. Seguidamente se filtró la infusión del poroto mung, se adicionó el agar, se agitó con una varilla de vidrio y se llevó a volumen de 1 L con AD.

3.2.2 Aislados

Para la caracterización morfológica de *D. teres* se utilizaron diez aislados provenientes de la colección de 17 cepas (ver sección 2.3). Los criterios de selección fueron: que pertenezcan a diferentes campañas agrícolas para la elaboración de un perfil de sensibilidad a fungicidas, buena esporulación y que de cinco aislados de la región norte y sur de producción de cebada de Argentina, en donde la presión de la MR y la aplicación de fungicidas es variable (Tabla 2).

Tabla 2. Aislados de *D. teres* utilizados en la medición de los conidios de distintos orígenes geográficos, variedades y campañas agrícolas.

Nº	Aislado	Localidad	Zona	Campaña	Variedad	Fecha de aislamiento
1	36T	Victoria (Entre Ríos)	N	2015/2016	Andreia	08/08/2016
2	LT	Ascensión, Gral. Arenales Bs. As.	N	2015/2016	Traveler	17/08/2016
3	JT	Colón, Bs As	N	2015/2016	Scarlett	17/08/2016
4	30T	Chacabuco, Bs As	N	2015/2016	Traveler	30/06/2016
5	DT	San Pedro, Bs As	N	2008/2009	Scarlett	15/06/2016
6	32T	San Cayetano, Bs As	S	2015/2016	Andreia	28/06/2016
7	BT	Carlos Casares, Bs As	SO	2013/2014	Scarlett	15/06/2016
8	FT	Coronel Suárez, Bs As	S	2000/2001	Scarlett	06/09/2016
9	40T	Dorrego, Bs As	S	2015/2016	Andreia	08/08/2016
10	12T	Gral. Pico, La Pampa	SO	2015/2016	MP 2121	08/08/2016

3.2.3 Medición de los conidios de *D. teres*

Se eligieron 10 aislados de *D. teres* según los criterios mencionados anteriormente. Para inducir la esporulación de los aislados de *D. teres*, se colocaron cuatro cubos de agar (4 mm de diámetro) obtenidos del margen de cultivos de 7 días de incubación (a 24°C bajo ciclos de 12 horas de luz cercana a la UV y 12 horas de oscuridad en APG) en cuatro puntos sobre medio V8 - 20% (Marzani, 2011) (Fig. 8). Las cajas inoculadas fueron incubadas (Percival Scientific *Intellus Control System*) por 12 días a 24°C con alternancia de 24 horas de luz blanca (40W) y 24 horas de oscuridad.

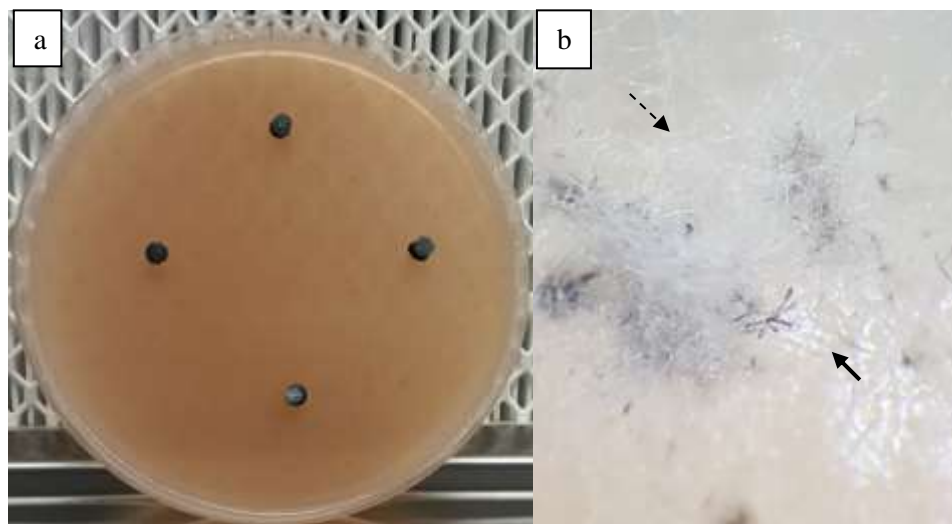


Figura 8. a) Caja de Petri con medio V8 - 20% inoculada con cuatro discos de micelio de *D. teres* b) Micelio (flecha punteada) y esporulación (flecha sólida) de *D. teres* sobre medio de cultivo V8 - 20 %.

Una vez que se verificó la esporulación, se transportó a un portaobjetos fragmentos de micelio junto con los conidios procedentes de 5 puntos elegidos al azar de la caja. Luego, se determinó la longitud, ancho y el número de septos de 50 conidios elegidos aleatoriamente con un microscopio óptico con regla graduada. Seguidamente, los valores obtenidos fueron multiplicados por un factor de conversión para transformar el valor a μm .

3.2.4 Inducción de la esporulación con otros medios de cultivo

Para inducir la esporulación de *D. teres* en los aislados 12T, 32T, 30T y 36T (nula o poca esporulación en medio V8 - 20%) se efectuó un ensayo adicional en los medios de cultivo ETT, APL, CT - 10%, CT - 5%, PT, V8 - 10%, V8 - 20% y APM.

Se utilizaron cultivos jóvenes y la inoculación se efectuó colocando en el centro de cada caja de Petri un disco de micelio de 4 mm de diámetro. Las cajas de Petri fueron incubadas a 24°C y dos condiciones de luz y oscuridad. Se incubaron con alternancia de 24 horas de luz blanca (40 W) y 24 horas de oscuridad (condición 1), y ciclos de 12 horas de luz cercana a la UV y 12 horas de oscuridad (condición 2). Para generar la condición 1, se utilizó una incubadora de crecimiento de plantas (Percival Scientific *Intellus Control System*). Se utilizaron dos repeticiones para cada condición de incubación. A los 12 días se verificó la esporulación observando preparados microscópicos de fragmentos de micelio y conidios, obtenidos de 5 puntos elegidos al azar de cada medio de cultivo.

3.2.5 Análisis de los datos

La longitud, ancho y número de septos de los conidios de *D. teres* de diferentes aislados se analizaron mediante análisis de varianza no paramétrico (Kruskal Wallis) y comparación de medias por rangos con el programa estadístico Infostat.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Caracterización morfológica de los aislados de *D. teres* obtenidos de semillas de cebada de distintas localidades

Los conidios observados bajo microscopio en esta investigación fueron de color fuliginoso a marrón oliváceo, cilíndrico, con células basales normalmente infladas, en pocos casos las células basales más largas que anchas, con clara cicatriz. La longitud y ancho promedio de los conidios, de *D. teres* fue $35,7 - 78,3 \times 10 - 16,6 \mu\text{m}$, siendo los valores mínimos y máximos $18 - 98 \times 9 - 21 \mu\text{m}$, respectivamente (Tabla 3, Tabla 4, Fig. 9) con 2 - 6 septos por conidio sobre medio de cultivo V8 - 20%. No se evidenció esporulación de los aislados 30T y 12T sobre el medio de cultivo V8 - 20%, lo cual limitó la medición de los conidios en estos aislados. Se hallaron diferencias estadísticas significativas en las dimensiones de los conidios de los 8 aislados.

La longitud de los conidios de los 8 aislados estudiados varió entre 18 y 98 μm , con un promedio de 53,8 μm . El aislado 36T presentó el menor valor medio con 43,2 μm , seguido de los aislados LT (48,7 μm), BT (50,1 μm), 32T (50,6 μm) y JT (50,9 μm) sin diferencias estadísticas (Tabla 3).

El ancho de los conidios varió de 9 y 21 μm , valor promedio de 13,2 μm . Los menores anchos de conidios promedios se registraron en los aislados LT y 36 T con 11,2 μm , BT (12,7 μm) y JT (12 μm) sin diferencias estadísticas; mientras que los mayores valores promedios se presentaron en los aislados DT con 16 μm y FT con 15,7 μm , sin diferencias estadísticas (Tabla 4).

El número de septos osciló entre 2 - 6 por conidio, siendo los aislados JT, LT y 36T con el menor valor promedio de septos (2,5), BT y 32T con 2,8 septos por conidio y 40T con 3,1 septos sin diferencias estadísticas (Tabla 4). Los aislados FT (3,3) y DT (3,2) registraron el mayor número medio de septos con diferencias significativas del resto de los aislados, a excepción del aislado 40T (Tabla 4).

El largo, ancho y número de septos por conidio de los aislados de *D. teres* varió según las medias de la región norte y sur. Las mayores dimensiones del largo y ancho, y número de septos por conidio se observaron con diferencias significativas (Kruskal Wallis) en los aislados provenientes del sur, con 55,93 μm , 14,24 μm y 3,1 respectivamente (Tabla 5).

3.3.2 Inducción de la esporulación con otros medios de cultivo

La esporulación del aislado 32T solo se registró sobre el medio V8 - 20% bajo ciclos de 24 horas de luz blanca y 24 horas de oscuridad a 24°C (condición 1). Los aislados 12T y 30T no esporularon sobre los 8 medios de cultivos evaluados bajo las dos condiciones de incubación. Se evidenció la esporulación del aislado 36T sobre los medios de cultivo V8-20%, V8 - 10%, ETT, PT, CT - 10% bajo la condición 2 (ciclos de 12 horas de luz cercana a la ultravioleta y 12 horas de oscuridad a 24°C).

La esporulación del aislado 36T bajo la condición 1 se presentó en los medios V8 - 20%, V8 - 10%, ETT, PT, CT - 10% y APL. La esporulación del aislado 36T sobre el medio APL solo se evidenció debajo del disco de micelio.

Tabla 3. Largo de los conidios de *D. teres* obtenidos de semillas de cebada de distintas localidades. D.E: Desviación estándar.

Aislado	Largo(μm)			D.E
	Min	Máx	Media*	
40T	40	96	62,4cd	19,47
JT	40	78	50,9abc	10
BT	34	70	50,1abc	9,9
32T	38	74	50,6bc	8,36
FT	40	80	58,9d	10,86
LT	18	78	48,7ab	11,94
DT	40	98	65,9d	14,49
36T	36	53	43,2a	5,07

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Tabla 4. Ancho de los conidios de *D. teres* obtenidos de semillas de cebada de distintas localidades D.E: Desviación estándar.

Aislado	Ancho(μm)			D.E
	Min	Máx	Media*	
40T	10	16	13,4b	1,85
JT	10	14	12,0ab	1,34
BT	10	17	12,7ab	1,71
32T	10	17	13,2b	1,53
FT	11	20	15,7c	2,7
LT	9	14	11,2a	1,24
DT	10	21	16,0c	2,7
36T	10	14	11,2a	1,32

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Tabla 5. Número de septos de los conidios de *D. teres* obtenidos de semillas de cebada de distintas localidades. D.E: Desviación estándar.

Aislado	Septos			D.E
	Min	Máx	Media*	
40T	2	5	3,1abc	1,07
JT	2	4	2,5a	0,68
BT	2	5	2,8ab	0,88
32T	2	4	2,8ab	0,64
FT	2	6	3,3c	0,99
LT	2	5	2,5a	0,71
DT	2	5	3,2bc	0,79
36T	2	3	2,5a	0,53

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes
($p < 0,05$)

Tabla 6. Valores medios del largo, ancho y número de septos de los conidios de *D. teres* por región. D.E: Desviación estándar. N: Norte; S: Sur.

Región	Largo(μm)	D.E	Ancho(μm)	D.E	Septos(μm)	D.E
	Media*		Media*		Media*	
N	52,41a	13,68	12,49a	2,53	2,7a	0,75
S	55,93b	12,84	14,24b	2,5	3,1b	0,93

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes
($p < 0,05$)

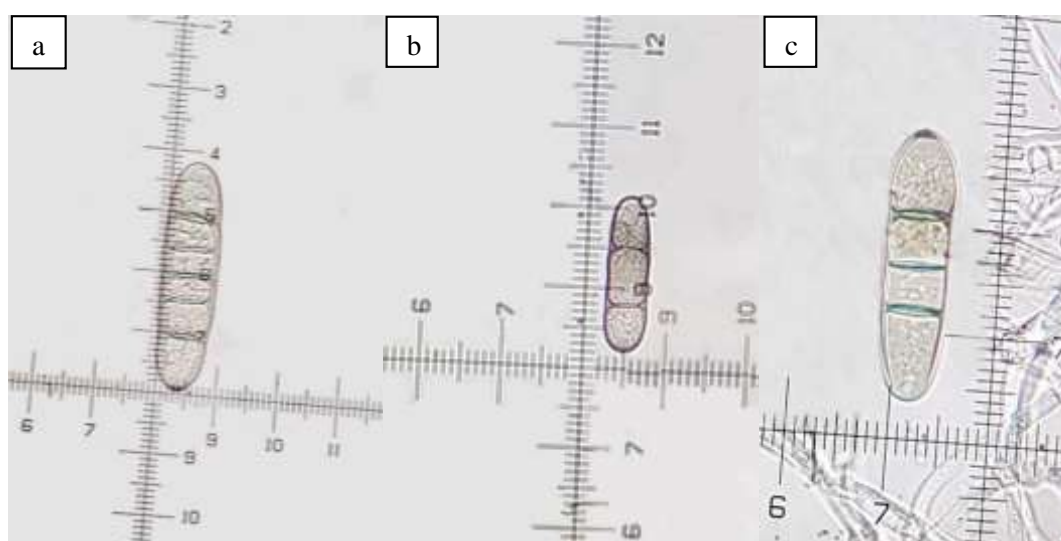


Figura 9. Conidios de *D. teres* (40X). a) DT, b) 36T y c) FT.

3.4 DISCUSIÓN

Las características morfológicas observadas coinciden con las descritas por Chidambaram *et al.* (1973) y Smedegaard-Petersen (1971) en relación a las dimensiones y número de septos, respectivamente. Las mayores dimensiones de largo (55,93 μm) y ancho (14,24 μm), y número de septos (3,1) de conidios se registraron en los aislados del sur de producción de cebada de la Argentina. Se registró variación en las dimensiones del largo y ancho de los conidios de 8 aislados de *D. teres*, con rangos y valores medios de 18 - 98 μm y 53,8 μm , y 9 - 21 μm y 13,2 μm , respectivamente. Igualmente, en Kenya la diversidad morfológica de *D. teres* también ha sido reportada por Owino *et al.* (2013); sugiriendo la presencia de varias subespecies de *D. teres*. Las diferencias observadas en las dimensiones y número de septos en los conidios de *D. teres* en este estudio pueden ser debidas a la variabilidad genética de este patógeno reportada por varios autores (Frazzon *et al.*, 2002; Lehmensiek *et al.*, 2010; Statkevičiūtė *et al.*, 2010; Akhavan *et al.*, 2016; Elwood *et al.*, 2018). Las diferencias en el largo, ancho y número de septos de conidios también han sido reportadas en otros patógenos del maíz como *E. turcicum* (De Rossi *et al.*, 2015b) y en *B. sorokiniana* (agente causal de la mancha marrón de la cebada) (Barba *et al.*, 2004).

Se han utilizado diferentes métodos para inducir la esporulación de *D. teres* como la inoculación de hojas de cebada con discos de micelio (Marzani, 2011), medios de cultivo (agar avena maní, agar extracto de malta, agar poroto lima, agar jugo V8, jugo de vegetales V5) con diferentes regímenes de luz y temperaturas (Al-Tikrity, 1987; Peever y Milgroom, 1994; Jonsson *et al.*, 1997; Douiyssi *et al.*, 1998; Wordell Filho *et al.*, 2002; Arabi *et al.*, 2003; Karakaya y Akyol, 2006; Tuohy *et al.*, 2006; Ordon *et al.*, 2007; Marzani, 2011; Akhavan *et al.*, 2017b) y la producción masiva de conidios con inoculaciones de hojas de cebada (Thomas, 1984).

La esporulación de *D. teres* en comparación con otras especies del género *Drechslera* es pobre sobre medio de cultivo (Deadman y Cooke, 1985). Marzani *et al.* (2013) evaluando la sensibilidad *in vivo* de *D. teres* a cuatro estrobilurinas, utilizaron un inóculo que incluyó fragmentos de micelio y conidios debido a la pobre esporulación evidenciada sobre diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación. Marzani (2011) evidencia la nula esporulación de 22 aislados de *D. teres* sobre los medios de cultivo Czapeck's modificado, agar extracto de malta, agar pasta de tomate y la buena a parcial esporulación de estos aislados sobre los medios de cultivo V8 (50%), V8 (100%), PDA (100%), PDA (50%) y PDA (25%), a excepción del aislado 1522 de *D. teres*. En este estudio la esporulación de los aislados de *D. teres* ocurrió en 8 aislados de 10 evaluados sobre medio V8 - 20%.

En este ensayo se registró que la inclusión de nuevos medios de cultivo (V8 - 10%, ETT, PT, CT-5%, CT-10%, APL y APM) no indujo la esporulación de los aislados 30T y 12T. En términos generales el medio de cultivo que mejor facilitó la esporulación fue el medio de cultivo V8 - 20%. Sin embargo, en este ensayo se evidenció que la esporulación es variable dependiendo del aislado y que no existe un medio de cultivo que favorezca la esporulación de todos los aislados de *D. teres*. Es así como, nuevos métodos de inducción de la esporulación de *D. teres* a nivel *in vitro* deberían ser desarrollados para facilitar los trabajos de investigación en este patosistema.

La mayor esporulación observada bajo lupa se registró en los aislados FT, 40T, LT y BT. Las colonias miceliales de estos aislados fueron de color blanco, centro marrón grisáceo

y textura flocosa; en el aislado FT se observó abundante tufts (penachos de color blanco) sobre medio de cultivo agar papa glucosa (incubado a 24°C bajo oscuridad) (datos no presentados). Los aislados DT, 30T, 32T, JT y 36T presentaron pobre esporulación sobre medio de cultivo V8 - 20% (bajo ciclos de 12 horas de luz cercana a la ultravioleta y 12 horas de oscuridad a 24°C), color de micelio blanco y textura flocosa sobre medio de cultivo APG y oscuridad total (24°C) (datos no presentados). Similarmente Owino *et al.* (2013) observaron que los aislados de *D. teres* con mayor esporulación estuvieron asociados a colonias miceliales de texturas granulares.

Sin embargo, un próximo ensayo debería incluir el conteo de conidios; el cual sería un método objetivo para determinar a los aislados que presenten mayor esporulación sobre los diferentes medios de cultivos.

3.5 CONCLUSIONES

Se caracterizó morfológicamente a los aislados 40T, JT, BT, 32T, FT, LT, DT y 36T de *D. teres*.

Los aislados de *D. teres* de la región sur de producción de cebada de la Argentina presentaron un mayor largo, ancho y número de septos de los conidios, con respecto a los del norte.

Se observó variabilidad en el largo, ancho y número de septos de los conidios de *D. teres*.

La esporulación de *D. teres* es pobre sobre medio de cultivo y variable entre los aislados estudiados. La nula esporulación de los aislados 30T (Chacabuco, Buenos Aires) y 12T (Gral. Pico, La Pampa) de *D. teres* limitó la medición de los conidios en estos aislados. El desafío en la investigación patológica estará relacionado en desarrollar un medio de cultivo que favorezca la esporulación de todos los aislados de *D. teres*.

La adición de nuevos medios de cultivos como V8 - 10%, ETT, PT, CT - 5%, CT - 10%, APL y APM no indujeron la esporulación de *D. teres*. El medio de cultivo V8 - 20% resultó ser el que mejor favoreció la esporulación de la mayoría de los aislados evaluados.

Capítulo IV

Sensibilidad *in vitro* de los aislados de *Drechslera teres*

4.1 INTRODUCCIÓN

Los fungicidas se han utilizado durante más de 200 años para proteger a las plantas del ataque de enfermedades causadas por hongos. Desde sus comienzos, el número de cultivos y enfermedades tratadas, los productos químicos disponibles, el área y la frecuencia de su uso, y la efectividad de los tratamientos, han aumentado enormemente, especialmente desde la Segunda Guerra mundial para proteger principalmente las semillas de cereales y vides (Brent y Hollomon, 2007a).

Los fungicidas son introducidos en el mercado con un específico objeto de control (hongo) y cada uno de ellos en teoría requiere una línea base (perfil de sensibilidad). Sin embargo, la experiencia sugiere que algunos hongos son más propensos al desarrollo de la resistencia, otros menos propensos y en algunos casos, no ha habido evidencia real del desarrollo de resistencia hasta la fecha (Russell, 2004).

Cabe destacar que antes de la introducción de un nuevo fungicida al mercado es relevante efectuar los estudios de sensibilidad de los aislados de los principales patógenos objeto de control. Estos estudios se efectúan para desarrollar métodos de determinación del grado de sensibilidad del patógeno objeto de estudio al fungicida, detectar cambios de sensibilidad entre aislados y obtener datos que sirvan de línea base (Brent y Hollomon, 2007b).

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* a fungicidas se pueden realizar para patógenos no obligados y obligados, aunque para estos últimos los métodos generalmente se restringen a formas de evaluación que involucran la germinación de esporas (Russell, 2004). Si el patógeno puede ser cultivado fácilmente sobre agar u otro medio de cultivo es razonable que la investigación comience basándose en el establecimiento de procedimientos de respuesta a la dosis, sobre este medio. También, es importante saber efectuar las mediciones del diámetro de la colonia, las que normalmente se hacen sobre dos diámetros de la colonia en ángulos rectos. Por ejemplo, se debe examinar el disco de micelio antes de tomar cualquier medida, para asegurarse de que el crecimiento fúngico que se está registrando realmente está creciendo sobre el medio de cultivo y no sobre la parte superior del disco de micelio (Russell, 2004).

En la Argentina no hay registros de estudios de sensibilidad *in vitro* de *D. teres* a las mezclas comerciales de fungicidas que se utilizan para el manejo de la MR. El objetivo de este estudio fue establecer el perfil de sensibilidad *in vitro* de aislados de *D. teres* obtenidos, a los principios activos fungicidas de las mezclas comerciales más utilizados en Argentina para el cultivo de cebada, que contengan IQe, ISDHs, IDMs, determinando la CI₅₀ para cada mezcla.

4.2 METODOLOGÍA

La evaluación de la sensibilidad de los aislados de *D. teres* a nivel *in vitro* se efectuó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

4.2.1 Determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀)

4.2.1.1 Fungicidas

Para los test de sensibilidad de *D. teres* se usaron los fungicidas listados en la tabla 7.

Tabla 7. Mezclas de fungicidas y concentración (g/L).

Nombre comercial	Principio activo	Concentración (g/L)
Orquesta Ultra (BASF)	Pyraclostrobina (IQe)	81
	Epoxiconazole (IDMs)	50
	Fluxapyroxad (ISDHs)	50
Cripton (BAYER)	Trifloxistrobina (IQe)	150
	Prothioconazole (IDMs)	175
Amistar Xtra (SYNGENTA)	Azoxystrobina (IQe)	200
	Cyproconazole (IDMs)	80
Cripton Xpro (BAYER)	Trifloxistrobina (IQe)	150
	Prothioconazole (IDMs)	175
	Bixafen (ISDHs)	125
Reflect Xtra (SYNGENTA)	Isopyrazam (ISDHs)	125
	Azoxystrobina (IQe)	200

4.2.1.2 Aislados

En la evaluación de la sensibilidad *in vitro* a las mezclas de fungicidas se utilizaron 10 aislados de *D. teres* descriptos anteriormente en la tabla 2.

4.2.1.3 Crecimiento micelial *in vitro* en APG modificado con fungicidas

Los fungicidas se esterilizaron por filtración y se adicionaron a medio estéril agar papa glucosado (APG) a ocho concentraciones variables de 0; 0,004; 0,01; 0,4; 1; 10; 40 y 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fungicida formulado (Carmona *et al.*, 2017). El medio de cultivo APG se preparó a base de papa, agar y dextrosa (ver sección 3.2.1.2). Se prepararon dos soluciones madres de cada fungicida, una de 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y otra de 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para facilitar la preparación de las concentraciones de los fungicidas. Éstos, se agregaron al APG en un matraz aforado de 250 mL, cuando el medio alcanzó una temperatura aproximada de 50°C. La concentración de 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ representó el control de cada experimento. A continuación, el medio preparado con las distintas concentraciones de cada fungicida se ubicó en placas de Petri de 9 cm de diámetro y en el centro de cada una de ellas se colocó un disco micelial de 4 mm, extraído del margen de cultivos en APG de

D. teres de 7 días de incubación (a 24°C bajo ciclos de 12 horas de luz cercana a la ultravioleta y 12 horas de oscuridad). Las cajas de Petri inoculadas se ubicaron en una incubadora VELD SCIENTIFICA FOC 225 E a 24°C en oscuridad (Locke, 2000; Marzani, 2011; Marzani *et al.*, 2013) con un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. El ensayo se realizó dos veces. El crecimiento micelial se cuantificó a los 5 días utilizando el promedio de dos mediciones (en direcciones perpendiculares) de la colonia con un calibre digital (DIGIMESS No 1304I, China) y posteriormente, se determinó la CI₅₀ (dosis efectiva capaz de inhibir el 50% del crecimiento relativo micelial) por regresión no lineal, usando un ajuste logarítmico simple. Además se fotografiaron todos los tratamientos.

La sensibilidad de los aislados se clasificó según la escala propuesta por Edgington *et al.* (1971), usada principalmente para evaluar la sensibilidad de hongos Basidiomycetes a los benzimidazoles. Posteriormente, su uso se generalizó para Ascomycetes (Reis *et al.*, 1997; Avozani, 2011; Tonin *et al.*, 2015) y su reacción a otros grupos de fungicidas (IQe, IDMs e ISDHs).

Un aislado es insensible cuando la CI₅₀ > 50 µg mL⁻¹, posee baja sensibilidad cuando la CI₅₀ tiene valores entre 10 y 50 µg mL⁻¹; sensibilidad moderada cuando la CI₅₀ se encuentra entre 1 y 10 µg mL⁻¹; y alta sensibilidad cuando CI₅₀ < 1 µg mL⁻¹.

4.2.2 Clasificación de la potencia de los fungicidas más frecuentemente usados en el cultivo de cebada para *D. teres*

Una vez obtenidas las CI₅₀ de cada mezcla fungicida, se efectuó una clasificación de cada una de ellas de acuerdo a su fungitoxicidad. Para esto, se utilizó el criterio propuesto por Edgington *et al.* (1971), donde aquellos fungicidas que presentaron una CI₅₀ < 1 µg mL⁻¹ fueron considerados altamente fungitóxicos; con una CI₅₀ entre 1 y 10 µg mL⁻¹ fueron moderadamente fungitóxicos, con CI₅₀ entre 10 y 50 µg mL⁻¹ fueron de baja fungitoxicidad y con una CI₅₀ > 50 µg mL⁻¹ fueron considerados no tóxicos.

4.2.3 Determinación del factor de reducción de sensibilidad (FRS)

El factor de reducción de sensibilidad se calculó como:

FRS = valor de CI₅₀ para el aislado estudiado / CI₅₀ media para el aislado más sensible (Reis y Carmona, 2011; Corio-Costet, 2015).

Si el FRS es 1, la sensibilidad no ha cambiado; si es >1, indica que está ocurriendo una reducción en la sensibilidad (Reis y Carmona, 2011).

Se seleccionó el aislado FT (Coronel Suárez, Bs As) como el más sensible o de referencia (Reis y Carmona, 2011) debido a que durante la campaña agrícola 2000/2001 no se había expuesto aun a las cinco mezclas de fungicida descriptas en la tabla 7.

4.2.4 Análisis estadístico

Para el cálculo de la CI_{50} se ajustó una regresión logarítmica simple. La regresión no lineal se efectuó entre las variables crecimiento micelial relativo de cada aislado (como una proporción del control) y las concentraciones de fungicidas según Campbell y Crous (2002) y por extrapolación se estimó la CI_{50} . Adicionalmente se efectuó un análisis de varianza no paramétrico (Kruskal – Wallis Nemenyi) para los valores de CI_{50} y una prueba de comparación múltiple de medias de Dunn. Los valores de FRS (aislados, fungicidas) fueron analizados con un análisis de varianza no paramétrico (Friedman), seguido de comparación de medias Post Hoc. Para todos los procedimientos estadísticos se utilizó el software R (R Core Team, 2018).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Sensibilidad *in vitro* de los aislados de *D. teres*

El análisis de varianza evidenció que no existen diferencias significativas en la sensibilidad de los aislados del norte respecto a los del sur (Tabla 8). Los aislados de la región norte presentaron una CI_{50} entre $0,081 - 0,141 \mu\text{g mL}^{-1}$ con un promedio de $0,116 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que los de la región sur oscilaron entre $0,057 - 0,084 \mu\text{g mL}^{-1}$ con un promedio de $0,071 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabla 8 y 9, apéndice 1).

No se registraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre el aislado DT con mayor CI_{50} ($0,141 \mu\text{g. mL}^{-1}$) respecto al aislado BT con menor CI_{50} promedio ($0,057 \mu\text{g. mL}^{-1}$). Si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas, los aislados con menor CI_{50} fueron BT, FT, 12T, 40T, 32T y 30T; mientras que los de mayor CI_{50} fueron DT, 36T, LT y JT (Tabla 9, apéndice 2).

Todos los aislados de *D. teres* fueron altamente sensibles a los fungicidas evaluados en el presente trabajo, presentando para IAZ, FEP, TPB, TP y AZC valores de CI_{50} entre $0,026$ y $0,055 \mu\text{g. mL}^{-1}$, $0,018$ y $0,047 \mu\text{g. mL}^{-1}$, $0,004$ y $0,059 \mu\text{g. mL}^{-1}$, $0,074$ y $0,234 \mu\text{g. mL}^{-1}$ y $0,078 - 0,526 \mu\text{g. mL}^{-1}$, respectivamente (Tabla 11 - 15).

Las mezclas de fungicidas con mayor fungitoxicidad fueron FEP, IAZ y TPB, y difirieron con diferencias estadísticas significativas de AZC y TP. Los fungicidas con mayor valor de CI_{50} promedio para todos los aislados fueron AZC con $0,226 \mu\text{g. mL}^{-1}$, seguido de TP con $0,126 \mu\text{g. mL}^{-1}$ sin diferencias estadísticas significativas (Tabla 10, Fig. 10, apéndice 2).

En términos generales, para todos los aislados los valores más bajos de CI_{50} a los fungicidas se registraron en el fungicida FEP, a excepción del aislado DT donde su más alta sensibilidad se presentó con el fungicida TPB. Los valores más altos de CI_{50} se observaron en el fungicida AZC, a excepción del aislado FT donde su más baja sensibilidad se registró en el fungicida TP. Estos resultados evidencian la alta fungitoxicidad de la triple mezcla de fungicida FEP (ISDHs, IDMs, IQe), respecto a la doble mezcla de fungicida AZC (IQe, IDMs).

Tabla 8. CI₅₀ (µg. mL⁻¹) media de diez aislados de *D. teres* a cinco mezclas de fungicidas. EE: error estándar de las medias de CI₅₀ por región. CI₅₀ media de dos experimentos.

Región	Media*	EE
Norte	0,116a	0,0207
Sur	0,071a	0,00664

*Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente según la prueba de Dunn ($P<0,05$).

Tabla 9. Valores medios de CI₅₀ a cinco fungicidas para cada aislado de *D. teres*. EE: Error estándar de las medias de CI₅₀ de cada aislado. CI₅₀ media de dos experimentos.

Aislado	Localidad	Zona	Campaña	Media*	EE
36T	Victoria (Entre Ríos)	N	2015/2016	0,132a	0,0597
LT	Ascensión, Gral. Arenales Bs. As.	N	2015/2016	0,119a	0,0357
JT	Colon, Bs As	N	2015/2016	0,107a	0,0346
30T	Chacabuco, Bs As	N	2015/2016	0,081a	0,0222
DT	San Pedro, Bs As	N	2008/2009	0,141a	0,0697
32T	San Cayetano, Bs As	S	2015/2016	0,083a	0,0200
BT	Carlos Casares, Bs As	SO	2013/2014	0,057a	0,0154
FT	Coronel Suarez, Bs As	S	2000/2001	0,059a	0,00883
40T	Dorrego, Bs As	S	2015/2016	0,084a	0,0160
12T	Gral. Pico, La Pampa	SO	2015/2016	0,071a	0,0125

*Medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente según la prueba de Dunn ($P<0,05$).

Tabla 10. Concentración inhibitoria media (CI₅₀) promedio de diez aislados *D. teres* para los diferentes fungicidas analizados. EE: Error estándar de las medias de CI₅₀ de cada fungicida. CI₅₀ media de dos experimentos.

Fungicida	Media*	EE
Fluxapyroxad 5% + epoxiconazole 5% + piraclostrobina 8,1%	0,031 a	0,00250
Isopyrazam 12,5% + azoxistrobina 20%	0,043 a	0,00243
Azoxistrobina 20% + cyproconazole 8%	0,226 b	0,0392
Trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5%	0,126 b	0,0113
Trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5% + bixafen 12,5%	0,041 a	0,00471
*Medias en la misma columna seguidas de letras diferentes difieren significativamente ($P < 0,05$) según el test de comparación múltiple de pares de medias de Dunn		

La sensibilidad (estimada por medio del gradiente de concentración de cada fungicida) para cada aislado de *D. teres* resultó variable en función de las distintas concentraciones de fungicidas utilizados según el modelo de regresión no lineal ajustado para determinar la CI₅₀ (Tabla 11 - 15; Fig.10).

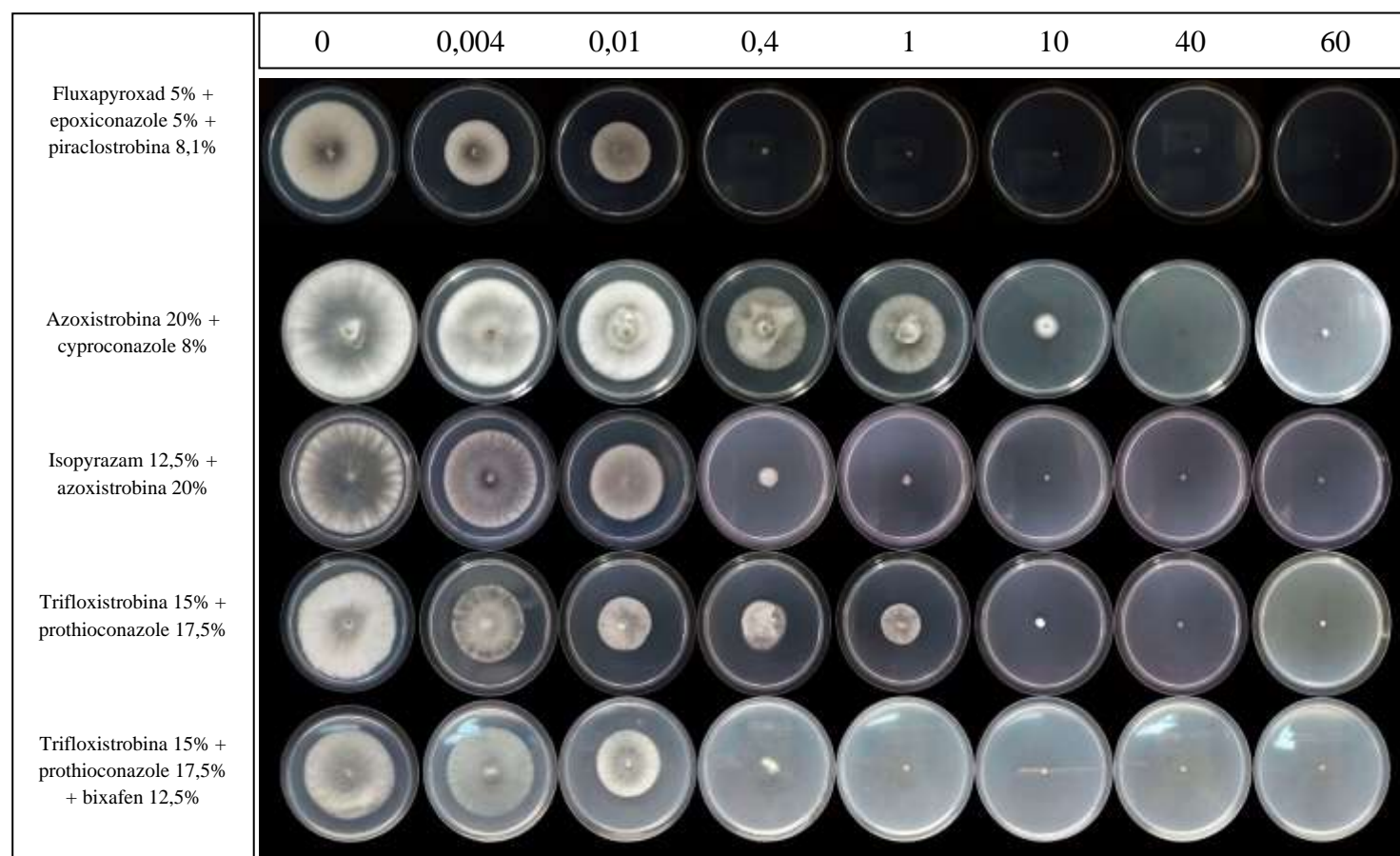


Figura 10. Crecimiento micelial de *D. teres* (aislado 30T) sobre medio de cultivo APG modificado con las concentraciones 0; 0,004; 0,01; 0,4; 1, 10, 40 y 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de mezclas de fungicidas.

Tabla 11. Dosis efectiva capaz de inhibir el 50% del crecimiento micelial relativo (CI₅₀, µg mL⁻¹) de aislados de *D. teres* para la mezcla de fungicida isopyrazam 12,5% + azoxistrobina 20%.

Aislado	Ensayo	Ecuación	R ²	CI ₅₀ (µg. mL ⁻¹)	Promedio CI ₅₀ (µg mL ⁻¹) *
BT	1	$y = -0,08\ln(x) + 0,2077$	0,9247	0,025	0,026 a
	2	$y = -0,081\ln(x) + 0,2101$	0,9235	0,027	
12T	1	$y = -0,088\ln(x) + 0,2331$	0,8925	0,048	0,046 a
	2	$y = -0,085\ln(x) + 0,2362$	0,9256	0,044	
32T	1	$y = -0,087\ln(x) + 0,2656$	0,9384	0,067	0,053 a
	2	$y = -0,086\ln(x) + 0,2218$	0,8932	0,039	
36T	1	$y = -0,085\ln(x) + 0,2288$	0,9071	0,041	0,037 a
	2	$y = -0,085\ln(x) + 0,2128$	0,8937	0,034	
LT	1	$y = -0,087\ln(x) + 0,2294$	0,8978	0,044	0,045 a
	2	$y = -0,084\ln(x) + 0,2412$	0,9288	0,045	
DT	1	$y = -0,08\ln(x) + 0,2039$	0,9182	0,024	0,029 a
	2	$y = -0,083\ln(x) + 0,2215$	0,9265	0,034	
40T	1	$y = -0,083\ln(x) + 0,2553$	0,9617	0,052	0,053 a
	2	$y = -0,084\ln(x) + 0,2545$	0,9569	0,053	
FT	1	$y = -0,081\ln(x) + 0,2385$	0,9596	0,039	0,040 a
	2	$y = -0,082\ln(x) + 0,2401$	0,9608	0,042	
JT	1	$y = -0,087\ln(x) + 0,2547$	0,9253	0,059	0,055 a
	2	$y = -0,086\ln(x) + 0,245$	0,9266	0,051	
30T	1	$y = -0,085\ln(x) + 0,2383$	0,9295	0,046	0,044 a
	2	$y = -0,084\ln(x) + 0,2335$	0,9151	0,041	

*Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Dunn ($P < 0,05$)

Tabla 12. Dosis efectiva capaz de inhibir el 50% del crecimiento micelial relativo (CI₅₀, µg mL⁻¹) de aislados de *D. teres* para la mezcla de fungicida fluxapyroxad 5% + epoxiconazole 5% + piraclostrobina 8,1%.

Aislado	Ensayo	Ecuación	R ²	CI ₅₀	Promedio CI ₅₀ *
BT	1	$y = -0,079\ln(x) + 0,1952$	0,912	0,021	0,021 a
	2	$y = -0,082\ln(x) + 0,1881$	0,8538	0,022	
12T	1	$y = -0,09\ln(x) + 0,2256$	0,8527	0,047	0,047 a
	2	$y = -0,09\ln(x) + 0,2256$	0,8527	0,047	
32T	1	$y = -0,078\ln(x) + 0,1861$	0,8927	0,017	0,022 a
	2	$y = -0,084\ln(x) + 0,1978$	0,8673	0,027	
36T	1	$y = -0,082\ln(x) + 0,1936$	0,8823	0,023	0,026 a
	2	$y = -0,085\ln(x) + 0,2009$	0,8479	0,029	
LT	1	$y = -0,085\ln(x) + 0,2184$	0,8947	0,035	0,034 a
	2	$y = -0,086\ln(x) + 0,2109$	0,8699	0,034	
DT	1	$y = -0,08\ln(x) + 0,1931$	0,8933	0,021	0,038 a
	2	$y = -0,09\ln(x) + 0,2392$	0,8595	0,055	
40T	1	$y = -0,084\ln(x) + 0,2284$	0,9216	0,043	0,04 a
	2	$y = -0,084\ln(x) + 0,2236$	0,9088	0,037	
FT	1	$y = -0,083\ln(x) + 0,2327$	0,9391	0,039	0,029 a
	2	$y = -0,078\ln(x) + 0,1957$	0,9025	0,02	
JT	1	$y = -0,085\ln(x) + 0,2069$	0,879	0,031	0,03 a
	2	$y = -0,085\ln(x) + 0,1991$	0,8594	0,029	
30T	1	$y = -0,078\ln(x) + 0,176$	0,879	0,015	0,018 a
	2	$y = -0,082\ln(x) + 0,1854$	0,8585	0,021	

*Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Dunn ($P < 0,05$)

Tabla 13. Dosis efectiva capaz de inhibir el 50% del crecimiento micelial relativo (CI₅₀, µg mL⁻¹) de aislados de *D. teres* para la mezcla de fungicida trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5% + bixafen 12,5%.

Aislado	Ensayo	Ecuación	R ²	CI ₅₀	Promedio CI ₅₀ *
BT	1	$y = -0,078\ln(x) + 0,1977$	0,9198	0,02	0,023 a
	2	$y = -0,08\ln(x) + 0,2089$	0,9314	0,026	
12T	1	$y = -0,091\ln(x) + 0,2424$	0,8636	0,058	0,046 a
	2	$y = -0,086\ln(x) + 0,2122$	0,8729	0,035	
32T	1	$y = -0,084\ln(x) + 0,1963$	0,8664	0,026	0,051 a
	2	$y = -0,097\ln(x) + 0,2511$	0,7971	0,076	
36T	1	$y = -0,089\ln(x) + 0,2237$	0,8652	0,044	0,057 a
	2	$y = -0,094\ln(x) + 0,2504$	0,8441	0,07	
LT	1	$y = -0,083\ln(x) + 0,2142$	0,9118	0,031	0,03 a
	2	$y = -0,082\ln(x) + 0,2112$	0,916	0,029	
DT	1	$y = -0,067\ln(x) + 0,1437$	0,823	0,0049	0,004 a
	2	$y = -0,065\ln(x) + 0,1256$	0,7812	0,0031	
40T	1	$y = -0,085\ln(x) + 0,2444$	0,9372	0,049	0,059 a
	2	$y = -0,089\ln(x) + 0,2631$	0,9252	0,069	
FT	1	$y = -0,083\ln(x) + 0,2445$	0,9568	0,046	0,049 a
	2	$y = -0,084\ln(x) + 0,2529$	0,9407	0,052	
JT	1	$y = -0,088\ln(x) + 0,262$	0,9143	0,066	0,043 a
	2	$y = -0,081\ln(x) + 0,1896$	0,8759	0,021	
30T	1	$y = -0,087\ln(x) + 0,2233$	0,8806	0,041	0,043 a
	2	$y = -0,087\ln(x) + 0,2303$	0,8955	0,045	

*Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Dunn ($P < 0,05$)

Tabla 14. Dosis efectiva capaz de inhibir el 50% del crecimiento micelial relativo (CI₅₀, µg mL⁻¹) de aislados de *D. teres* para la mezcla de fungicida azoxistrobina 20% + cyproconazole 8%.

Aislado	Ensayo	Ecuación	R ²	CI ₅₀	Promedio CI ₅₀ *
BT	1	$y = -0,071\ln(x) + 0,3631$	0,9545	0,145	0,14 a
	2	$y = -0,071\ln(x) + 0,3582$	0,9049	0,135	
12T	1	$y = -0,062\ln(x) + 0,3841$	0,7234	0,154	0,12 a
	2	$y = -0,069\ln(x) + 0,3313$	0,9179	0,086	
32T	1	$y = -0,076\ln(x) + 0,3231$	0,8894	0,097	0,152 a
	2	$y = -0,075\ln(x) + 0,3822$	0,9138	0,207	
36T	1	$y = -0,058\ln(x) + 0,3525$	0,5808	0,078	0,360 a
	2	$y = -0,068\ln(x) + 0,47$	0,7554	0,643	
LT	1	$y = -0,065\ln(x) + 0,3849$	0,923	0,17	0,249 a
	2	$y = -0,083\ln(x) + 0,4079$	0,9083	0,329	
DT	1	$y = -0,055\ln(x) + 0,4445$	0,8578	0,364	0,526 a
	2	$y = -0,056\ln(x) + 0,4792$	0,912	0,689	
40T	1	$y = -0,067\ln(x) + 0,3316$	0,966	0,08	0,133 a
	2	$y = -0,071\ln(x) + 0,3811$	0,901	0,187	
FT	1	$y = -0,078\ln(x) + 0,3166$	0,9459	0,095	0,078 a
	2	$y = -0,081\ln(x) + 0,2759$	0,9687	0,062	
JT	1	$y = -0,071\ln(x) + 0,4178$	0,9706	0,314	0,308 a
	2	$y = -0,081\ln(x) + 0,4034$	0,8919	0,303	
30T	1	$y = -0,066\ln(x) + 0,3798$	0,9066	0,161	0,193 a
	2	$y = -0,079\ln(x) + 0,3823$	0,9369	0,225	

*Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Dunn ($P < 0,05$)

Tabla 15. Dosis efectiva capaz de inhibir el 50% del crecimiento relativo micelial (CI₅₀, µg mL⁻¹) de aislados de *D. teres* para la mezcla de fungicida trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5%.

Aislado	Ensayo	Ecuación	R ²	CI ₅₀	Promedio CI ₅₀ *
BT	1	$y = -0,074\ln(x) + 0,2979$	0,9724	0,065	0,074 a
	2	$y = -0,08\ln(x) + 0,3026$	0,9836	0,084	
12T	1	$y = -0,069\ln(x) + 0,3572$	0,9254	0,126	0,097 a
	2	$y = -0,074\ln(x) + 0,302$	0,9546	0,068	
32T	1	$y = -0,069\ln(x) + 0,3452$	0,924	0,106	0,136 a
	2	$y = -0,082\ln(x) + 0,3534$	0,9676	0,167	
36T	1	$y = -0,071\ln(x) + 0,3865$	0,9104	0,202	0,177 a
	2	$y = -0,073\ln(x) + 0,3632$	0,9168	0,153	
LT	1	$y = -0,078\ln(x) + 0,393$	0,9538	0,253	0,234 a
	2	$y = -0,077\ln(x) + 0,3818$	0,9544	0,215	
DT	1	$y = -0,075\ln(x) + 0,3397$	0,9257	0,117	0,11 a
	2	$y = -0,076\ln(x) + 0,3274$	0,9101	0,103	
40T	1	$y = -0,078\ln(x) + 0,3459$	0,9255	0,138	0,134 a
	2	$y = -0,07\ln(x) + 0,3579$	0,8783	0,131	
FT	1	$y = -0,081\ln(x) + 0,3079$	0,9534	0,093	0,097 a
	2	$y = -0,084\ln(x) + 0,3075$	0,9684	0,101	
JT	1	$y = -0,07\ln(x) + 0,3352$	0,9033	0,094	0,097 a
	2	$y = -0,075\ln(x) + 0,3283$	0,948	0,101	
30T	1	$y = -0,075\ln(x) + 0,3021$	0,916	0,071	0,105 a
	2	$y = -0,075\ln(x) + 0,3526$	0,952	0,14	

*Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Dunn ($P < 0,05$)

4.3.2 Factor de reducción de la sensibilidad (FRS)

La reducción de sensibilidad al fungicida IAZ se evidenció en los aislados JT, 32T, 40T, 12T y LT. Para el fungicida FEP, la alteración de la sensibilidad se registró en los aislados 12T, 40T, DT y LT. En el fungicida TPB, los valores de FRS superiores a 1 se registraron en los aislados 40T, 36T y 32T. Todos los aislados presentaron alteración de la sensibilidad al fungicida AZC, registrando el valor más alto de FRS con 6,67 en el aislado DT. La alteración de la sensibilidad de los aislados al fungicida TP, se evidenció en los aislados LT, 36T, 32T, 40T y DT. El análisis de varianza no paramétrico (Friedman) evidenció que no existen diferencias significativas entre los FRS de los aislados, pero si entre los FRS de los fungicidas. El FRS de las mezclas de fungicidas TPB, IAZ y FEP difirió significativamente de la mezcla de fungicida AZC, pero no de la mezcla TP. Las mezclas de fungicida TP y AZC registraron los valores medios de FRS mas altos sin diferencias significativas entre estos (Tabla 16, apéndice 3).

Tabla 16. Factor de reducción de sensibilidad de los aislados de *D. teres* analizados.

Fungicida	Factor de reducción de sensibilidad										Media*	EE
	Aislado											
	36T	LT	JT	30T	DT	32T	BT	40T	12T			
Isopyrazam 12,5% + azoxystrobina 20%	0,92	1,12	1,37	1,1	0,72	1,32	0,65	1,32	1,15	1,07a	0,0871	
Fluxapyroxad 5% + epoxiconazole 5% + pyraclostrobina 8,1%	0,86	1,16	1	0,6	1,26	0,73	0,7	1,33	1,56	1,02a	0,109	
Trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5% + bixafen 12,5%	1,16	0,61	0,89	0,87	0,081	1,04	0,46	1,2	0,95	0,80a	0,121	
Trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5%	1,82	2,41	1	1	1,13	1,4	0,76	1,39	1	1,32ab	0,171	
Azoxystrobina 20% + cyproconazole 8%	4,55	3,15	3,89	2,44	6,67	1,92	1,77	1,69	1,51	3,06b	0,572	

*Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente según la prueba de Friedman (Post Hoc) ($P < 0,05$)

4.4 DISCUSIÓN

Dentro de las estrategias anti-resistencia a fungicidas, el uso de mezclas de diferentes principios activos son una de las herramientas más importantes que se dispone (Staub, 1991). En la Argentina, recientemente se han incorporado fungicidas en base a mezclas de ISDHs con IQe y/o con IDMs, para el manejo de la MR (Carmona y Sautua, 2015). Por ejemplo, en el cultivo de cebada para el manejo de la MR en el año 2015 se introdujo la mezcla fungicida TP (Agrofy News, 2018) y en 2017, esta misma mezcla con la adición de bixafen 12,5 % (Lu24, 2018), en el año 2012 la mezcla FEP (Eldiaonline, 2018), y en el 2011 la mezcla IAZ (La Nación, 2018). Para la campaña agrícola 2000/2001 los fungicidas más usados eran tebuconazole y propiconazole (Carmona *et al.*, 2001) y en esa misma campaña se lanzó AZC (La Nación, 2018). En este ensayo, una de las mezclas de fungicida (AZC) con mayor cantidad de años de uso registró reducción de sensibilidad en todos los aislados de *D. teres* con factores de reducción de sensibilidad en el rango 1,51 – 6,67 y mayor valor medio de CI_{50} (0,23 μ g/ml). Una explicación a este resultado está relacionada con que es el fungicida con mayor cantidad de años de uso para el manejo de la MR y muchos productores de cebada usaron dosis divididas o no recomendadas por el marbete (ficha técnica del fungicida). En contraste, TPB introducida en el año 2017 y evaluada *in vitro* con aislados de *D. teres* de las campañas agrícolas 2015/2016, 2013/2014, 2008/2009 y 2000/2001 resultó ser uno de los fungicidas más fungitóxicos para todos los aislados con CI_{50} promedio de 0,04 μ g/ml y un rango de factor de reducción de sensibilidad de los aislados de 0,081 – 1,2.

El monitoreo del grado de sensibilidad de las poblaciones del patógeno objetivo, a uno o más fungicidas es crucial para obtener una evidencia temprana de una situación de resistencia inminente, verificar la funcionalidad de las estrategias de manejo, investigar la aparente pérdida de eficacia de un fungicida y/ o para brindar orientación sobre la selección de futuros tratamientos en un determinado sitio (Brent y Hollomon, 2007a). En este ensayo se estudió la sensibilidad de diez aislados de *D. teres* a cinco fungicidas, patógeno que presenta un mediano riesgo de resistencia a los fungicidas (FRAC, 2018).

Los resultados del presente estudio proporcionan un importante y primer perfil de sensibilidad de los aislados de *D. teres* a las mezclas de fungicidas que se encuentran registradas para el manejo de la MR en la Argentina y actualmente es el único disponible en el país.

La evidencia experimental acerca del efecto del incremento o disminución de la dosis en el desarrollo de la resistencia a fungicida en diferentes combinaciones de patosistemas y fungicidas, muestra que incrementando la dosis aumenta la selección para la resistencia (van den Bosch *et al.*, 2011). También, se ha registrado la disminución de la sensibilidad de los aislados de *D. teres* a los fungicidas del grupo IDMs, cuando se incrementa el número de aplicaciones en el ciclo del cultivo. Locke (2000) evidenció una clara tendencia hacia una disminución en la sensibilidad de los aislados de *D. teres* con incrementos en el número de aplicaciones de propiconazole, flusilazole, epoxiconazole y procloraz en el cultivo de cebada. En este experimento se registró que los aislados de las localidades muestreadas de la región norte y sur no difirieron significativamente en cuanto a la sensibilidad (medida sobre la CI_{50} promedio), donde con 2 – 3 aplicaciones (fungicidas) promedio es similar para ambas regiones, norte y sur.

En relación con la mutación de aislados *D. teres* a los IQe y la eficacia en campo de los fungicidas se han registrado varios estudios. En Europa, Marzani (2011) registró la variabilidad en la sensibilidad (medida sobre la CI_{50}) de 23 aislados de *D. teres* (sensibles y con presencia de la mutación F129L). Esta mutación generalmente produce factores de resistencia más bajos y, estudios han demostrado que diferentes IQe no son igualmente afectados por la mutación F129L (Pasche *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 2004). Semar *et al.* (2007) agregan, que la eficacia a campo de pyraclostrobina no es afectada por la mutación F129L de aislados de *D. teres*. Por su parte, la mutación G143A también asociada a la resistencia de los IQe es improbable que ocurra en *D. teres* debido a que este patógeno presenta en la secuencia del gen *cyt b* (citocromo b) un intrón después del codón 143 (Grasso *et al.*, 2006). La estructura del gen *cyt b* en el codón 143 de miles de aislados de *D. teres* ha sido analizado en las últimas décadas y todas ellas fueron idénticas (Stammler, 2014b). Por otro lado, Marzani (2011) registró una alta frecuencia de la mutación F129L en aislados de *D. teres*, pero la mutación G143A no fue encontrada. En este ensayo, se observó una marcada reducción de sensibilidad de los aislados de *D. teres* a las mezclas de fungicida AZC y TP (IQe + IDMs) a nivel *in vitro*; sin embargo es poco probable que ocurra una pérdida de sensibilidad a estos fungicidas por una mutación F129L del hongo a las estrobilurinas (azoxystrobina, trifloxistrobina). En otras palabras, al no estar presente la mutación G143A en *D. teres*, la pérdida de sensibilidad a las estrobilurinas es poco probable que ocurra y solo se registra una reducción de la sensibilidad en caso de estar presente la mutación F129L.

Se ha registrado alta sensibilidad en aislados de *D. teres* a la mezcla fungicida prothioconazole + fluaxostrobina (Marzani, 2011) y epoxiconazole (Locke, 2000). En *D.*

tritici-repentis, se ha registrado alta sensibilidad para el protriokonazole (Tonin *et al.*, 2017) y epoxiconazole (Beard *et al.*, 2009). En este estudio los fungicidas TP y AZC, registraron alta fungitoxicidad a todos los aislados de *D. teres*.

Igualmente, todos los aislados de *D. teres* resultaron con alta sensibilidad para las mezclas de fungicida que contenían carboxamidas (IAZ, FEP y TPB). Rehfus *et al.* (2016) mostraron alta sensibilidad en aislados de *D. teres* para fluxapirroxad, bixafen e isopyrazam. Sin embargo, no es posible hacer comparaciones dado que en este estudio se determinó la CI_{50} a través de la inhibición del crecimiento micelial sobre agar modificado con fungicida y en el ensayo de Rehfus *et al.* (2016) se utilizaron pruebas de microtitulación con suspensiones de conidios. Otra razón por la que no es posible hacer comparaciones directas con la literatura, es debido a que en este estudio se utilizaron mezclas comerciales de fungicidas y no grado técnico puro de fungicidas.

En el presente trabajo no se hallaron aislados de *D. teres* resistentes a fungicidas como los reportados por Campbell y Crous (2002) para triadimenol y Akhavan *et al.* (2017a) para propiconazole. Todos los fungicidas evaluados a nivel *in vitro* fueron altamente fungitóxicos para los aislados de *D. teres*. El argumento teórico, la evidencia experimental y la experiencia práctica indican que la acumulación de resistencia se ve muy favorecida por el uso sostenido y único de fungicidas con mecanismos de acción específicos (Brent y Hollomon, 2007a). Es así como, dentro de las estrategias de manejo de la resistencia a fungicida se recomiendan mezclas de fungicidas con multisitios y monositios sin resistencia cruzada conocida o con diferente modo de acción (Brent y Hollomon, 2007a). En este experimento se evidenció a nivel *in vitro* la eficacia de todas las mezclas fungicidas en la inhibición del crecimiento micelial de *D. teres*.

En este experimento se constató que una cepa que no ha estado expuesta a un fungicida se considera sensible (Reis y Carmona 2013), como es el caso del aislado FT ($CI_{50} = 0,059 \mu\text{g mL}^{-1}$). La cepa FT de la campaña agrícola 2000/2001 no ha estado expuesta a una tasa y frecuencia de las mezclas de nuevos principios activos fungicidas (IDMs +IQe, IDMs +IQe +ISDHs e IQe + ISDHs) según los factores de resistencia de Beckerman (2013). Este aislado sirvió de línea base y permitió el cálculo del factor de reducción de sensibilidad a todas las mezclas de fungicidas.

Locke (2000) demostró la reducción de sensibilidad de aislados de *D. teres* a los fungicidas propiconazole y procloraz en el período 1988 - 1999. En monitoreos de la sensibilidad de los aislados de *D. teres* a los ISDHs en diferentes países de Europa, se detectaron dos aislados con sensibilidad fuera del rango de la línea base en el norte de Alemania (Rehfus *et al.*, 2016). Estos aislados presentaron la mutación en la subunidad B de la succinato deshidrogenasa (SDH - B), denominadas B - H277Y (sustitución de histidina por tirosina en la posición del aminoácido 277). Adicionalmente, el mayor impacto en la pérdida de la eficacia del fluxapyroxad en condiciones de invernáculo, se observó con la mutación C - H134R (histidina por arginina en la subunidad C del succinato deshidrogenasa), utilizando una tercera parte de la dosis recomendada a campo ($41,7 \text{ ingrediente activo ha}^{-1}$) (Rehfus *et al.*, 2016). Rehfus (2018), registró un rango de factor de resistencia de aislados con presencia de mutaciones a los ISDHs de 0,25 – 204 para los fungicidas bixafen, fluxapyroxad, benzovindiflupyr, isopyrazam, penthiopyrad y fluopyram.

El efecto del agregado de las carboxamidas (ISDHs) a las mezclas de estrobilurina o estrobilurina más triazol, no se pudo determinar en este trabajo por la imposibilidad de obtener los ingredientes activos por separado.

4.5 CONCLUSIONES

Todos los aislados de *D. teres* evaluados *in vitro* fueron altamente sensibles a las mezclas comerciales de fungicidas y por lo tanto estas mezclas se pueden utilizar dentro del manejo químico de la MR y no representarían un riesgo para acelerar el desarrollo de aislados resistentes.

No se detectaron aislados resistentes a los fungicidas testeados.

En este experimento se obtuvo un perfil de sensibilidad de aislados de *D. teres*. Se cuenta desde ahora con una línea base para el monitoreo de los cambios en la sensibilidad de *D. teres* a las mezclas de fungicidas AZC, FEP, IAZ, TP y TPB, necesaria también para desarrollar estrategias de manejo de la MR de la cebada en la Argentina.

Del presente trabajo se deduce que la reducción de la sensibilidad de los aislados de *D. teres* está ocurriendo para las mezclas de fungicida AZC y TP, registrando los valores medios más altos de FRS. Estos fungicidas tuvieron una CI_{50} significativamente mayor que el resto.

La cepa FT de *D. teres* permitió calcular la reducción de la sensibilidad a todas las mezclas de fungicidas, y servirá como referencia para estudios posteriores de sensibilidad a fungicidas.

Capítulo V

Sensibilidad *in vivo* de aislados de *Drechslera teres*

5.1 INTRODUCCIÓN

El monitoreo de la resistencia se debe complementar con la evaluación de la eficiencia práctica del fungicida. El conocimiento del grado de eficacia del control logrado a campo por un determinado fungicida generalmente no se encuentra disponible o está disponible, pero mal registrado. Sin embargo, el monitoreo de la eficiencia de control a campo es un elemento práctico, crítico e indicador del inicio de pérdida de sensibilidad u ocurrencia de resistencia. Las observaciones sistemáticas, año tras año, deberían realizarse sobre la intensidad de enfermedad en cultivos comerciales tratados y no tratados con el fungicida en riesgo, y también en cualquier ensayo de parcela replicado que se realice. Para confirmar que la resistencia práctica ha aparecido, es esencial establecer una correlación clara, en el tiempo y espacio, entre la incidencia de biotipos resistentes y el deterioro de la eficacia a campo del fungicida (Brent y Hollomon, 2007b).

La sensibilidad *in vivo* es frecuentemente evaluada en patógenos obligados y necrotróficos. Por ejemplo, se ha evaluado la sensibilidad *in vivo* en patógenos obligados como la roya asiática de la soja *P. pachyrhizi* (Reis *et al.*, 2015), la roya de los lirios de un día *Puccinia hemerocallidis* (Emmitt *et al.*, 2018), la roya anaranjada del trigo *P. triticina* (Arduim *et al.*, 2012; Turra *et al.*, 2017) y en patógenos necrotróficos como *D. teres* (Marzani, 2011; Rehfus, 2018).

La experiencia ha demostrado que el riesgo de resistencia puede variar mucho entre las regiones donde la presión de la enfermedad y el uso de fungicidas son altos, y las áreas vecinas, donde hay menos enfermedad o donde los rendimientos son demasiado bajos para soportar el uso generalizado de fungicida (Brent y Hollomon, 2007b).

El objetivo de este trabajo es evaluar la sensibilidad *in vivo* de los aislados de *D. teres* con menor (región sur de producción de cebada, mayor presión de manchas foliares) y mayor CI₅₀ (región norte de producción de cebada, menor intensidad de manchas foliares) a la mezcla del fungicida más fungitóxico, de acuerdo con los ensayos *in vitro* analizados en el capítulo anterior: Uno de ellos fue fluxapyroxad 5% + epoxiconazole 5% + pyraclostrobina 8,1%.

Actualmente, en la Argentina no hay publicaciones que correlacionen la sensibilidad *in vitro* con la sensibilidad *in vivo* de aislados de *D. teres* a fungicidas.

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Localización

La evaluación de la sensibilidad *in vivo* de los aislados de *D. teres* se efectuó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

5.2.2 Evaluación de la sensibilidad *in vivo*

Previo a la evaluación de la sensibilidad *in vivo* se efectuaron los siguientes pasos: 1) determinación de la incidencia de patógenos en semillas de cebada 2) tratamiento químico de semillas 3) verificación de la susceptibilidad del cultivar de cebada a *D. teres* y 4) cámara húmeda para verificar los postulados de Koch.

En función de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, se seleccionó el fungicida con la mayor fungitoxicidad y los aislados con menor y mayor CI₅₀. Los tratamientos se describen en la tabla 17. Se utilizaron plantas de cebada de la variedad Shakira, con susceptibilidad reconocida a *D. teres* (Cattaneo, 2018b). La unidad experimental estuvo representada por una maceta con 5 plantas. Las macetas se dispusieron en un diseño de bloques completamente al azar con nueve repeticiones. En este experimento se denominó preventivo (pre-inoculación) y curativo (post-inoculación) a la aplicación de fungicida 24 horas antes o 24 horas después de la inoculación con *D. teres*, respectivamente.

Se seleccionaron el aislado de menor CI₅₀ (FT; CI₅₀ = 0,059 µg mL⁻¹) y mayor CI₅₀ (DT, CI₅₀ = 0,14 µg mL⁻¹), teniendo en cuenta la CI₅₀ media de todos los fungicidas. Debido a que el aislado DT presentó bajo nivel de esporulación *in vitro*, se reemplazó por el aislado LT (CI₅₀ = 0,12 µg mL⁻¹), con nivel de sensibilidad similar y con alto nivel de esporulación *in vitro*.

Se utilizó la mezcla de fungicida FEP debido a que registró el menor valor medio de CI₅₀ (0,03 µg mL⁻¹) para todos los aislados, presenta acción preventiva (estrobilurina, carboxamida) y curativa (triazol), y tiene mayor tiempo de uso en el mercado que la triple mezcla TPB con nivel de fungitoxicidad similar (0,04 µg mL⁻¹).

5.2.3 Incidencia en semillas de cebada

La incubación de las semillas de cebada cv. Shakira y la determinación de la incidencia de los patógenos en la semilla se realizaron según los pasos descritos en la sección 2.2.2. Se registró un 8% de incidencia en semillas de *D. teres*, 2% de *Bipolaris sorokiniana*, 20% de *Cladosporium spp.* y 4 % de *Epicocum spp.*

Tabla 17. Descripción de los tratamientos.

Tratamiento	Descripción
T ₁	Testigo sin inoculación ni pulverización química
T ₂	Testigo que sólo presente la aplicación de fungicida
T ₃	Aplicación de la cepa de menor CI ₅₀ en la prueba <i>in vitro</i>
T ₄	Aplicación de la cepa de mayor CI ₅₀ en la prueba <i>in vitro</i>
T ₅	Aplicación de fungicida y a las 24 horas la aplicación de la cepa de menor CI ₅₀ en la prueba <i>in vitro</i>
T ₆	Aplicación de fungicida y a las 24 horas la aplicación de la cepa de mayor CI ₅₀ en la prueba <i>in vitro</i>
T ₇	Aplicación de la cepa de menor CI ₅₀ en la prueba <i>in vitro</i> primero y a las 24 horas aplicación de fungicida
T ₈	Aplicación de la cepa de mayor CI ₅₀ en la prueba <i>in vitro</i> primero y a las 24 horas aplicación de fungicida

5.2.4 Tratamiento químico de semillas de cebada

Se utilizaron semillas de cebada (cv. Shakira) tratadas con Iminoctadine (30% EC; dosis: 210 ml / 100 kg de semilla), no tratadas con Iminoctadine sin desinfección de hipoclorito de sodio y no tratadas con Iminoctadine con desinfección de hipoclorito de sodio (1%). Se seleccionó este fungicida para el tratamiento de la semilla de cebada porque erradica a *D. teres* (Carmona *et al.*, 1999). Se sembraron 10 semillas por cada caja de Petri. Las cajas fueron incubadas a 24°C bajo ciclos de 12 horas de luz cercana a la UV y 12 horas de oscuridad. Se registró la emergencia de plántulas *in vitro* y la incidencia de los patógenos en semilla a los 7 días después de la siembra con la ayuda de un estereoscopio (Leica S6E). El tratamiento de semillas con Iminoctadine presentó una eficacia del 100%, dado que el nivel de incidencia en semillas de *D. teres* fue 0% (Tabla 18). Se registró una emergencia de plántulas del 91,4% en las semillas tratadas con Iminoctadine, 90% en las semillas no tratadas sin desinfección y 97,5% en las semillas no tratadas con desinfección con hipoclorito 1%.

Tabla 18. Incidencia de hongos en semillas de cebada tratada con Iminoctadine (30% EC), no tratadas sin y con desinfección.

Hongo	Tratada	Incidencia (%)	
		No tratada sin desinfección	No tratada con desinfección
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0	0	0
<i>Drechslera teres</i>	0	6,6	0
<i>Alternaria spp.</i>	5,7	73,3	15
<i>Cladosporium spp.</i>	1,42	3,3	0
<i>Drechslera spp.</i>	0	3,3	0

5.2.5 Verificación de la susceptibilidad del cultivar de cebada a *D. teres*

Se sembraron 10 semillas por maceta del cv. Shakira. La siembra se efectuó en cuatro macetas con semillas tratadas (Iminoctadine EC 30%; dosis: 210 ml / 100 kg de semilla) y en una maceta con semillas sin tratar. La siembra se efectuó a una profundidad de 3 cm y a una distancia de 1 cm entre semillas. Se utilizaron macetas de 13,5 cm de diámetro y 20 cm de altura con una mezcla a base de arena y el sustrato comercial Growmix Multipro (Terraferil) para el desarrollo de las plantas en la proporción 1:4, respectivamente. El riego se efectuó en forma manual con una frecuencia de aplicación de día por medio. No se aplicó fertilizantes en este experimento. A los 8 días después de la siembra, se registró la emergencia de plántulas, las que se ralearon a los 10 días después de la siembra, dejando 5 plántulas por maceta.

5.2.5.1 Inducción de la esporulación

Se utilizó el aislado FT de *D. teres* de Coronel Suarez, Bs As de la campaña agrícola: 2000/2001. La inducción de la esporulación de *D. teres* se efectuó en el medio V8 - 20%. Se colocaron cubos de agar (4 mm de diámetro) obtenidos del margen de cultivos de *D. teres* de 7 días de incubación (a 24°C bajo ciclos de 12 horas de luz cercana a la ultravioleta y 12 horas de oscuridad sobre medio APG) en cuatro puntos sobre medio V8 - 20%. Las cajas inoculadas fueron incubadas por 12 días a 24°C con alternancia de 24 horas de luz blanca (40W) y 24 horas de oscuridad.

5.2.5.2 Preparación del inóculo

Se agregaron 10 mL de agua destilada estéril (ADE) sobre la caja de Petri, se dejó reposar por 2 min aproximadamente. Seguidamente, con la espátula de Drigalsky se raspó suavemente la superficie de la colonia de *D. teres*, con la finalidad de remover la mayor cantidad de conidios. Se filtró la suspensión con ayuda de una gasa para retener los restos de micelio o de medio de cultivo. Se vertió la suspensión de conidios en 90 mL de ADE, se mezcló con la ayuda de un vórtex por 5 minutos a 800 rpm. Posteriormente, se extrajeron con pipeta 10 µL de la suspensión de conidios y se depositaron a cada lado de la cámara de Neubauer (Tipo H) para el conteo de conidios. Se ubicaron los cuadrantes de la cámara con la ayuda de un microscopio óptico (40X). Se efectuó el conteo de conidios similarmente para 4 gotas (10 µL) y se efectuó un promedio de conidios. mL⁻¹. Se obtuvieron 180 ml de una suspensión con una concentración de $2,9 \times 10^4$ conidios. mL⁻¹, a partir de cinco cajas de Petri con medio V8 - 20%. A la suspensión de conidios se le adicionaron 480 µL de tensioactivo (Tween 20) por litro de agua (Reis *et al.*, 2014).

5.2.5.3 Inoculación

La inoculación de las plantas se efectuó con la ayuda de un pulverizador (EAGLE FORTRESS; volumen máximo 130 ml) a los 28 días después de la siembra (estado fisiológico Z1.4 según la escala de Zadoks *et al.*, 1974) a una concentración de inóculo de *D. teres* de $2,9 \times 10^4$ conidios. mL⁻¹ hasta el punto de escurrimiento de las hojas. Previo a la inoculación se aplicó riego y se instalaron trípodes de alambre galvanizado en cada maceta, con la finalidad de aislar las hojas de la bolsa plástica y evitar consecuentemente el efecto lupa (quemadura de hojas por el sol). Una vez que se aplicó el inóculo, las macetas se cubrieron con bolsas plásticas (50 cm x 70 cm) transparentes humedecidas

con agua destilada durante 48 horas 3 de las macetas y a 24 horas las 2 macetas restantes, para favorecer la infección por parte del patógeno (Fig. 11). Transcurrido el tiempo, las bolsas plásticas se retiraron y se aplicó agua destilada a las hojas inoculadas con la ayuda de un pulverizador, para aumentar la humedad relativa y facilitar la esporulación. A los 7 días después de la inoculación, se utilizó la escala de Tekauz (1985) para verificar la susceptibilidad del cultivar de cebada a *D. teres* (Fig.12).



Figura 11. Bolsas plásticas sobre las macetas para favorecer la infección por *D. teres*.

5.2.5.4 Cámara húmeda de muestras foliares

Con la finalidad de verificar los postulados de Koch se efectuó una cámara húmeda, colocando sectores (0,8 cm x 2 cm) de hojas infectadas de cebada sobre dos portaobjetos dispuestos en cruz en una caja de Petri (9 cm de diámetro) con 3 capas de papel filtro humedecido. Las hojas fueron incubadas a 24°C con ciclos de 12 horas con luz cercana a UV y 12 horas de oscuridad.

5.2.6 Sensibilidad *in vivo* de los aislados de menor y mayor CI₅₀ proveniente de la prueba *in vitro* a la mezcla de fungicida FEP

Se sembraron 72 macetas (8 tratamientos x 9 repeticiones) sin fertilizantes. La siembra, el tratamiento de la semilla, el riego, el sustrato, la profundidad de siembra, distancia de siembra y raleo de plántulas se realizó como en la sección 5.2.5.

La inducción de la esporulación de los aislados (FT, LT) de *D. teres*, preparación y aplicación del inóculo se efectuó como en la sección 5.2.5.



Figura 12. a) Escala de 10 puntos de Tekauz (1985). b) Infección de genotipos de cebada por *D. teres*, 10 días después de la inoculación. Fuente: Jalli, 2010.

Se utilizó una suspensión de conidios con una concentración de 5×10^3 conidios. mL^{-1} para cada aislado de *D. teres*. Se utilizó esta concentración de conidios, dado que la concentración de $2,9 \times 10^4$ conidios. mL^{-1} utilizada en el ensayo de verificación de la susceptibilidad a *D. teres*, generó un nivel muy alto de la enfermedad a los 7 días después de la inoculación, lo cual dificultaba la evaluación de la severidad por la presencia de marchitamiento en las cuatro hojas inoculadas. Se aplicó el inóculo según los tratamientos descritos en la tabla 17 y posteriormente se colocaron bolsas plásticas transparentes humedecidas con AD durante 24 horas. Se retiraron las bolsas plásticas y se aplicó el fungicida en los tratamientos T7 y T8, y en los tratamientos T5 y T6, se aplicó el fungicida y a las 24 horas se inoculó.

5.2.7 Aplicación de fungicida y equipo de aplicación

Para la aplicación de la mezcla de fungicida (FEP) se utilizó una mochila pulverizadora manual, con botalón de 2 metros de longitud con 4 picos abanico plano uniforme (Pastilla: TeeJect 110 015 VP), con erogación de 100 L. ha^{-1} a presión constante ($40 \text{ libras. pulgada}^{-2}$), accionada mediante tubo de gas carbónico (CO_2) a un paso de $5,04 \text{ Km.h}^{-1}$. El fungicida se aplicó según la dosis del marbete (1200 mL. ha^{-1}). Las macetas se ubicaron en dos bandas de aplicación de $0,3 \text{ m} \times 3 \text{ m}$, con una capacidad de 22 macetas en cada banda y dejando un espacio entre bandas de $0,8 \text{ m}$ para el recorrido del aplicador (Fig. 13).



Figura 13. Aplicación de fungicida a las plantas de cebada en estado fisiológico Z 1.4.

5.2.8 Incidencia de la enfermedad

La incidencia de la enfermedad por planta se calculó a los 7 días después de la inoculación mediante la siguiente ecuación en 5 hojas por planta (25 hojas por maceta):

$$I(\%) = \frac{He \times 100}{Th}$$

En donde:

I (%): Incidencia de la enfermedad

He: Número de hojas enfermas

Th: Total de hojas evaluadas

5.2.9 Severidad de la enfermedad

La severidad de la enfermedad se evaluó a los 7 días después de la inoculación, mediante escala gráfica (James, 1971) previo entrenamiento visual con el software “Distrain” (Tomerlin y Howell, 1988). El cálculo de la severidad promedio en 5 hojas por planta se efectuó mediante la siguiente fórmula:

$$S(\%) = \frac{\sum Sh \times 100}{Th}$$

En donde:

S (%): Severidad promedio de la enfermedad en términos porcentuales

$\sum Sh$: Sumatoria de severidades de cada hoja

Th: Total de hojas evaluadas

Con los valores de incidencia y severidad de la enfermedad se determinó además, el porcentaje de control (PC). Éste se determinó mediante la siguiente formula

$$PC = \frac{(Porcentaje\ de\ infección\ del\ testigo - porcentaje\ de\ infección\ del\ tratamiento\ con\ fungicida) \times 100}{porcentaje\ de\ infección\ del\ testigo}$$

donde el porcentaje de infección se expresa como incidencia (%) o severidad (%).

5.2.10 Análisis estadístico

Se efectuó un análisis de varianza no paramétrico (Kruskal Wallis Nemenyi) para determinar la existencia de diferencias significativas en la severidad de la enfermedad en los distintos tratamientos de fungicidas y aislados de *D. teres*, un análisis de contrastes entre la severidad de los tratamientos y un análisis de comparación de medias múltiple por Tukey y Kramer (Nemenyi). Se utilizó el software R (R versión 3.5, R Development Core Team, 2018).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Susceptibilidad del cv. Shakira a *D. teres*

Las primeras lesiones se observaron a las 72 horas después de la inoculación. La MR avanzó muy rápido, dado que se registraron marchitamientos a los 7 días después de la inoculación (Fig.14). Las hojas enfermas alcanzaron el valor 10 (muy susceptible) según la escala de Tekauz (1985). Se verificó la esporulación de *D. teres* sobre las hojas de cebada, confirmando con ésto los postulados de Koch (Fig. 15). No se registraron diferencias en los niveles de infección de la MR entre las plantas que provenían de semilla tratada y no tratada con Iminoctadine.

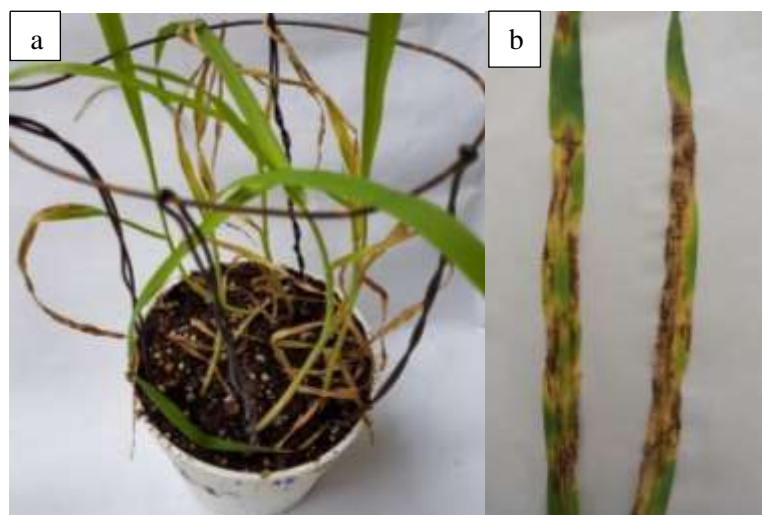


Figura 14. a) Marchitamiento de hojas de cebada (Z 1.5) inoculadas con *D. teres* a los 7 días después de la inoculación. Hojas nuevas (verdes) sin enfermedad b) Presencia de necrosis y clorosis en hojas de cebada a los 5 días después de la inoculación con *D. teres*.



Figura 15. Esporulaci3n de *D. teres* sobre segmento de hoja de cebada cv. Shakira.

5.3.2 Sensibilidad *in vivo* de los aislados de *D. teres*

No se registraron manchas foliares características de la MR en los tratamientos 1 y 2, evidenciando de esta manera la nula contaminación cruzada por in3culo en el experimento. No se observaron s3ntomas de fitotoxicidad en el tratamiento testigo de aplicaci3n de fungicida (T2), ni en los tratamientos de aplicaci3n de fungicida en forma preventiva (T5 y T6) y curativa (T7 y T8). Los primeros s3ntomas visibles de la MR en las hojas de cebada se observaron a las 48 horas despu3s de la inoculaci3n (T3 y 4) (Fig.16).



Figura 16. a) Desarrollo de los primeros síntomas foliares (flechas negras) de la mancha en red en hojas de cebada después de 48 horas de inoculación con *D. teres*. b) Mancha foliar característica de la enfermedad (flecha negra).

El efecto del fungicida sobre la severidad en planta fue significativamente diferente entre tratamientos. Se observó la eficacia de la aplicación del fungicida FEP en forma preventiva (aplicado un día antes) y curativa (un día después) en el control de la infección por *D. teres* en plantas de cebada (Tabla 19). Se registró 0% de incidencia y severidad en los tratamientos con aplicación preventiva (T5 y T6) y curativa (T7). En el tratamiento curativo (T8) se registró 0,625% de incidencia en planta y 0,0125% de severidad en hoja. El porcentaje de infección registrado en el tratamiento T8 fue el resultado de hallar una mancha foliar sobre 225 hojas de cebada evaluadas. En los tratamientos de control se registraron niveles de incidencia en planta y severidad en hojas de 87,5 % y 13,68 % en el tratamiento T3 (inoculación con el aislado FT), y 80% y 6,32% en el tratamiento 4 (inoculación con el aislado LT), respectivamente (Tabla 19, Fig. 17, apéndice 4). Se registró en promedio niveles de incidencia en planta y severidad en hoja de la mancha en red de 83,75% y 10%, respectivamente. Según la observación de las lesiones en las hojas (cv. Shakira), la reacción del cultivar a las cepas FT y LT de *D. teres* fue de alta susceptibilidad según la escala de Tekauz (1985).

El impacto de la aplicación de fungicida sobre el aislado FT y LT de *D. teres* en planta presentó un patrón similar al observado en los ensayos *in vitro*. Se registró en promedio 100% y 99,9% en el porcentaje de control (PC) de la enfermedad en los tratamientos con aplicación de FEP en forma preventiva y curativa, respectivamente. Los resultados evidencian la efectividad del tratamiento de la mezcla FEP en forma preventiva y curativa para el manejo de la MR de la cebada. De otra forma, el aislado de *D. teres* de menor CI_{50} (FT, Campaña agrícola 2000/2001) y mayor CI_{50} (LT, Campaña agrícola 2015/2016) proveniente de la prueba *in vitro* presentaron alta sensibilidad *in vivo* al fungicida de mayor fungitoxicidad (FEP).

Tabla 19. Severidad en hojas de cebada inoculadas con los aislados de menor y mayor CI₅₀ de *D. teres* y tratadas con la mezcla fungicida fluxapyroxad (5%) + epoxiconazole (5%) + pyraclostrobina (8,1%) antes y después de inocular.

Trat.	Descripción	S (%) *	EE
T ₁	Testigo sin inoculación ni pulverización química	0a	
T ₂	Testigo que sólo presente la aplicación de fungicida	0a	
T ₃	Cepa de menor CI ₅₀ en la prueba <i>in vitro</i>	13,68 b	1,94
T ₄	Cepa de mayor CI ₅₀ en la prueba <i>in vitro</i>	6,32 b	0,670
T ₅	Aplicación de fungicida y a las 24 horas la aplicación de la cepa de menor CI ₅₀	0a	
T ₆	Aplicación de fungicida y a las 24 horas la aplicación de la cepa de mayor CI ₅₀	0a	
T ₇	Aplicación de la cepa de menor CI ₅₀ primero y a las 24 horas aplicación de fungicida	0a	
T ₈	Aplicación de la cepa de mayor CI ₅₀ primero y a las 24 horas aplicación de fungicida	0,0125a	0,011

*Medias en la misma columna seguidas de letras diferentes difieren significativamente ($P < 0,05$) según el Test de comparación de pares de medias de Tukey y Kramer (Nemenyi). S: severidad; Trat: tratamiento.

La severidad promedio de la MR de los tratamientos testigos de inoculación (T3 y T4) difirió con alta significancia del promedio de la severidad registrada en los tratamientos de aplicación preventiva (T5 y T6) y curativa (T7 y T8), y de cada una de las severidades promedios de los tratamientos con aplicación preventiva (0%) y curativa (0,0062%).

5.4 DISCUSIÓN

El cultivar de cebada Shakira, susceptible a *D. teres*, presentó lesiones foliares típicas reticuladas de la MR, con estrías marrón oscuras extendiéndose con lesiones longitudinales y transversales como las citadas por Tekauz (1985) y Scott (1992) (Fig. 17).

Tuohy *et al.* (2006) evidenciaron la variación en la virulencia de los aislados de *D. teres* en cultivares de cebada de Irlanda y el norte de Europa, registrando cultivares resistentes a moderadamente susceptibles y susceptibles. Adicionalmente, los aislados de *D. teres* FN10 y N1 produjeron pocos síntomas, mientras que los aislados FN1 y N28 produjeron altos niveles de enfermedad. Wordell Filho *et al.* (2002) observaron una reacción diferencial entre los aislados de *D. teres* y cultivares de cebada de Brasil, reportando 14 y 13 cultivares susceptibles al aislado de *D. teres* 9720 y 9611, respectivamente. Jonsson *et al.* (1997) en un estudio de resistencia a la MR de la cebada, demostraron que las variedades comerciales de cebada presentaron susceptibilidad a todos los aislados suecos, pero unas pocas fueron resistentes al aislado canadiense de *D. teres*. En contraste, en este ensayo *in vivo* se verificó que el cultivar de cebada es muy susceptible a los aislados FT

y LT de *D. teres* según la escala de Tekauz (1985), sin variación en la reacción del cultivar a la infección de estas cepas. En los ensayos de verificación de susceptibilidad (inoculación con el aislado FT) del cultivar a *D. teres* se observó que a los 7 días después de la inoculación se registraron marchitamientos en todas las plantas inoculadas por maceta. Estos resultados dejan en evidencia que Shakira es muy susceptible a *D. teres*, confirmando lo hallado por Cattaneo (2018b).

Las mezclas FEP, IAZ y TPB no difirieron significativamente en la fungitoxicidad (medida sobre la CI_{50}) a los aislados de *D. teres*. La selección del fungicida para los ensayos *in vivo* se basó en que la mezcla de fungicida IAZ es principalmente de acción preventiva (estrobilurina + carboxamida). Al tratarse de un ensayo donde se evaluó la acción preventiva y curativa, se eligió una mezcla de fungicida que contenga acción preventiva (estrobilurina + carboxamida) y curativa (triazol). De esta manera, se eligió entre las triples mezclas TPB y FEP que obtuvieron bajos valores de CI_{50} . La selección entre las mezclas TPB y FEP, se basó en dos razones. La mezcla FEP está en el mercado desde el año 2012 y es uno de los fungicidas más usados en cebada; mientras que la mezcla TPB ha sido recientemente introducida en el mercado argentino. La otra razón consistió en que si bien entre las mezclas TPB y FEP no existen diferencias significativas, al tomar en cuenta los valores absolutos, FEP obtuvo el menor valor de CI_{50} ($0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$) promedio para todos los aislados.

Los resultados de este experimento demostraron que el tratamiento foliar con la mezcla de fungicida FEP aplicado a una dosis de 1200 mL ha^{-1} en forma preventiva y curativa es eficaz para la reducción de la severidad de la mancha en red en plantas de cebada en el estado de crecimiento Z 1.5 bajo condiciones de invernadero. El porcentaje de control promedio alcanzado por la mezcla de fungicida FEP aplicado 24 horas antes o 24 horas después de la inoculación con *D. teres* fue 99,9%. Los resultados presentados en este ensayo son similares a los reportados por Stepanović *et al.* (2016) y Semar *et al.* (2007). Stepanović *et al.* (2016), registraron que dos aplicaciones a campo de la mezcla de fungicida pyraclostrobina + epoxiconazole a una dosis de aplicación de 1.0 L. ha^{-1} fue el tratamiento más efectivo para el control de la MR e incrementó en un 39,1 % el rendimiento promedio de la cebada en los experimentos del año 2010 y 2011 comparado con el testigo enfermo. En suma, la eficacia de la mezcla de fungicida pyraclostrobina + epoxiconazole fue 91,8% y 97 % en el 2010 y 2011, respectivamente. Rehfus (2018), registró valores de eficacia en planta del fluxapyroxad cercanos al 100% en aislados sensibles. En este ensayo se utilizó una mezcla de fungicida de tres principios activos (fluxapyroxad, epoxiconazole, pyraclostrobina) con una alta eficacia, en la que el impacto de la carboxamida contribuyó en estos resultados, pero no es posible cuantificar de forma independiente.

La eficacia de este fungicida se corroboró, debido a que en las plantas que recibieron la aplicación del fungicida en forma preventiva (T5 y T6) y curativa (T7 y T8) registraron en promedio severidades del 0% y 0,0062%, respectivamente. Semar *et al.* (2007) en ensayos de eficacia a campo de la pyraclostrobina evidenciaron el buen control de la mancha en red en campos con diferente frecuencia de la mutación F129L de poblaciones de *D. teres*. Similarmente Marzani (2011) registró un porcentaje de control de la MR superior al 80% en los aislados de *D. teres* tipo salvaje por los fungicidas picoxistrobina y pyraclostrobina aplicados 48 horas antes de la inoculación. Menegon *et al.* (2005), registraron que una sola aplicación de fungicida (azoxistrobina; propiconazole +

ciproconazole) en forma preventiva (primero la aplicación de fungicida y después la aplicación del inóculo) evitó la infección por *B. sorokiniana* durante mas de 21 días.

En este experimento se utilizó una concentración de inóculo de 5×10^3 conidios mL^{-1} . Esta concentración permitió que se alcanzaran niveles de severidad de 13,68 y 6,32% a los 7 días después de la inoculación en las plantas inoculadas con la cepa FT y LT, respectivamente. La concentración de inóculo usada en este ensayo fue consistente con la usada por Leisova *et al.* (2006), quienes usaron un rango de concentración de inóculo de $5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ conidios mL^{-1} en un ensayo de cuantificación con PCR (tiempo real) de *D. teres* en hojas infectadas. Marzani *et al.* (2013) usaron exitosamente en sus ensayos de eficacia de cuatro estrobilurinas en planta una concentración de 1×10^4 conidios mL^{-1} de *D. teres* para producir síntomas uniformes. En diferentes ensayos de evaluación de resistencia de cultivares de cebada a *D. teres* se registraron concentraciones de inóculo dentro del rango $1 \times 10^4 - 2 \times 10^4$ conidios mL^{-1} (Wordell Filho *et al.*, 2002; Tuohy *et al.*, 2006; Akhavan *et al.*, 2017b).

Los alcances de este estudio establecieron que la mezcla fungicida fue eficaz en el control de la MR cuando se aplicó 24 horas antes o 24 horas después de la inoculación con *D. teres*. Sin embargo, la eficacia de esta mezcla debería evaluarse con tiempos de aplicación superiores a 24 horas; en otras palabras el nivel de infección alcanzado por *D. teres* a las 24 horas después de la inoculación fue distinto al registrado a las 48, 72 y 120 horas según las fases de infección de *D. teres* abordadas por Lightfoot y Able (2010).



Figura 17. Severidad de la enfermedad en las hojas de cebada cv. Shakira inoculadas con *D. teres*, estado de crecimiento Z.1.5.

5.5 CONCLUSIONES

Este estudio de sensibilidad *in vivo* de aislados de *D. teres* a la mezcla de fungicida FEP es el primero realizado en la Argentina. La aplicación en forma preventiva y curativa de FEP fue efectiva para el control químico de la MR. El control químico evitó que se alcanzaran niveles promedio de incidencia en planta y severidad en hojas del 83,75% y 10%, respectivamente. El porcentaje de control de la MR alcanzado por esta mezcla de fungicida fue en promedio 99,9 % en ambos tipos de aplicación (preventiva y curativa).

La reacción de las plantas de cebada (cv. Shakira) en el estado fisiológico Z 1.5 a la inoculación con los aislados FT y LT de *D. teres* fue muy susceptible.

Capítulo VI

Consideraciones finales

En esta investigación

- se obtuvieron 17 aislados de *D. teres* provenientes de las provincias Entre Ríos, La Pampa y Buenos Aires
- se estudió la macromorfología de los aislados;
- se estableció el perfil de sensibilidad *in vitro* de diez aislados de *D. teres* a cinco mezclas comerciales de fungicidas utilizadas en la Argentina para el control químico de la MR;
- se evaluó *in vivo* la eficacia del fungicida más fungitóxico en la prueba *in vitro* a los aislados con menor y mayor valor medio de CI_{50} , dada la diferencia no significativa entre aislados.

En esta sección se discutirán las hipótesis, los objetivos y los resultados del trabajo de investigación en forma integrada. También se abordarán las contribuciones del presente trabajo y futuros experimentos.

Análisis de las hipótesis de la investigación

La sensibilidad *in vitro* de los diferentes aislados de *D. teres* a los fungicidas en mezclas que contengan IDMs, ISDHs e IQe, no varía en función de la procedencia geográfica

No se rechaza la hipótesis, debido a que no hay diferencias significativas en la sensibilidad (estimada por medio de la CI_{50}) de aislados del norte con los del sur.

Los principios activos fungicidas (IQe, ISDHs, IDMs) en mezclas comerciales, que normalmente se utilizan en el cultivo de cebada en la Argentina, no presentan CI_{50} *in vitro* diferente entre sí para cada uno de los diferentes aislados de *D. teres*

Se rechaza la hipótesis. Los fungicidas testeados difieren entre sí en cuanto a la CI_{50} .

La sensibilidad *in vitro* de los diferentes aislados de *D. teres* es variable en función de las distintas concentraciones de fungicidas utilizados.

No se rechaza la hipótesis. La sensibilidad (estimada por medio del gradiente de concentración de cada fungicida) para cada aislado de *D. teres* varía en función de las distintas concentraciones de fungicidas utilizados. Todos los aislados son sensibles a los fungicidas evaluados. No se encontraron aislados resistentes a los principios activos fungicida evaluados en el presente trabajo.

Es posible clasificar los aislados de *D. teres* según su diferente sensibilidad a los fungicidas

Se rechaza la hipótesis. Por lo tanto, se infiere que no es posible clasificar los aislados de *D. teres* según su diferente sensibilidad (medida sobre la CI₅₀) a los fungicidas. Todos los aislados son altamente sensibles a los fungicidas testeados en el presente trabajo, de acuerdo con la escala propuesta por Edington (1971). No hay diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los aislados.

El aislado de menor sensibilidad de *D. teres* proveniente de la prueba *in vitro* presenta también baja sensibilidad al fungicida de mayor fungitoxicidad cuando es evaluado *in vivo*

Se rechaza la hipótesis, debido a que el aislado de mayor CI₅₀ (LT) *in vitro* resultó altamente sensible *in vivo*.

El aislado de mayor sensibilidad de *D. teres* proveniente de la prueba *in vitro* presenta también alta sensibilidad al fungicida de mayor fungitoxicidad cuando es evaluado *in vivo*

No se rechaza la hipótesis, debido a que el aislado de menor CI₅₀ (FT) *in vitro* resultó altamente sensible *in vivo*.

Análisis de los resultados e implicancias para futuros experimentos

La MR es una enfermedad prevalente en los cultivos de cebada de la Argentina. Sobre las muestras de semillas evaluadas, se registró una prevalencia del 42% y un rango de incidencia de *D. teres* de 0 a 25%. El método de detección de patógenos en la semilla por congelamiento profundo permitió el aislamiento de *D. teres*. Los aislados de *D. teres* que se obtuvieron en esta investigación serán útiles para nuevos estudios de sensibilidad de *D. teres* a fungicidas, morfología de las colonias de *D. teres*, métodos de inducción de esporulación, estudios moleculares, desarrollo de cultivares de cebada resistentes a *D. teres*, etc.

La pobre esporulación de este patógeno en medios de cultivo se confirmó en esta investigación como lo registrado en la literatura. Se registró el largo y ancho de los conidios de ocho aislados de *D. teres* de 10 analizados. Dentro de los aislados que mejor esporularon sobre medio V8 - 20% se encuentran el BT, FT, LT y 40T. Se ensayaron ocho medios de cultivo para inducir la esporulación de *D. teres*; sin embargo no se registró un medio de cultivo que indujera la esporulación de todos los aislados. El desafío de la investigación en patología vegetal estaría relacionado con el desarrollo de un medio de cultivo que induzca una esporulación abundante de todos los aislados de *D. teres*. El estudio de la morfología de *D. teres* de aislados provenientes del norte y sur de producción de cebada actualizó la información existente en la literatura referente en la Argentina.

Todos los aislados de *D. teres* registraron alta sensibilidad a las cinco mezclas comerciales de fungicida. Los valores promedios de CI₅₀ para los aislados estuvieron entre 0,057 (BT) y 0,141 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (DT). Los fungicidas con mayor y menor fungitoxicidad en la prueba *in vitro* estuvieron representados por FEP y AZC, respectivamente. Las mezclas de fungicidas IAZ, FEP, TPB, TP y AZC presentaron valores de CI₅₀ entre el

rango 0,026 – 0,055 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,018 – 0,047 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,004 – 0,059 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,074 – 0,234 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 0,078 – 0,526 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Los ensayos *in vitro* mostraron que todas las mezclas comerciales son altamente fungitóxicas a los 10 aislados de *D. teres*. Este estudio registró el primer perfil de sensibilidad de diez aislados de *D. teres* a cinco mezclas comerciales de fungicidas que se utilizan para el control de la MR de la cebada. El perfil de sensibilidad registrado en esta investigación será útil para el monitoreo de la sensibilidad de los aislados de *D. teres* a los fungicidas y facilitarán las estrategias de manejo de la MR a campo.

Según Russell (2004), para la mayoría de los casos una línea base de sensibilidad con 50 aislados testeados sería la más adecuada para lograr una información que represente la realidad sobre la sensibilidad de un determinado patógeno. Sin embargo, por limitaciones de recursos en esta tesis solo se evaluaron 10 aislados. En futuros ensayos de sensibilidad *in vitro* de aislados de *D. teres* sería recomendable que se utilizaran un mínimo de 30 - 50 aislados.

Otro campo por explorar es el estudio molecular de los genes implicados en la resistencia a IDMs, IQe e ISDHs y caracterizar los aislados sensibles y resistentes de *D. teres* en la Argentina, en la medida que se encuentre pérdida o reducción de sensibilidad en el campo.

Si nuevos fungicidas son introducidos en la Argentina para el control de la MR, la evaluación de la sensibilidad *in vitro* de este fungicida es el primer paso para el monitoreo y detección temprana de casos de resistencia a dicho fungicida.

El aislado sensible FT (Campaña agrícola 2000/2001) permitió determinar el factor de reducción de sensibilidad (FRS) a las cinco mezclas de fungicidas. Se observó una marcada reducción de sensibilidad en el fungicida AZC en todos los aislados, presentando el valor medio más alto de FRS (3,06) y sin diferencias estadísticas significativas con el fungicida TP, el cual presentó alteración en la sensibilidad con un rango de FRS 0,76 – 2,41 y valor medio de 1,32. Los valores medios más bajos de FRS para todos los aislados se observaron en las mezclas de fungicidas TPB, FEP e IAZ con 0,8, 1,02 y 1,07 respectivamente sin diferencias significativas.

En este estudio se verificó que una cepa no expuesta a las mezclas de nuevos principios activos fungicidas (IDMs + IQe, IDMs + IQe + ISDHs e IQe + ISDHs), como es el caso de la cepa FT resultó altamente sensible. La alta sensibilidad de esta cepa se verificó en los ensayos *in vitro* con todas las mezclas de fungicidas evaluadas en esta tesis e *in vivo* con la mezcla FEP. Este aislado representa una línea base orientativa y será útil para detectar cambios en la sensibilidad a todas las mezclas de fungicidas evaluados.

Los alcances de este estudio establecieron que la mezcla de fungicida FEP aplicado 24 horas antes o 24 horas después de la inoculación con *D. teres* sobre plantas de cebada en estado de crecimiento Z 1.5 registraron un porcentaje promedio de control del 99,9% de la MR. Sin embargo, deberían realizarse nuevos estudios en invernadero y a campo con un mayor número de aislados para corroborar la eficacia en planta de las cinco mezclas de fungicidas para el control de la MR de la cebada en la Argentina. Adicionalmente, otra investigación por efectuar es la evaluación de la sensibilidad de aislados de *D. teres* a principios técnicos puros (IDMs, ISDHs, IQe) y no a las mezclas comerciales.

Capítulo VII

Bibliografía

Agrofy News. www.news.agrofy.com.ar, acceso 2018.

Akhavan, A., Turkington, K., Kebede, B., Xi, K., Kumar, K., Tekauz, A., Kutcher, H and Strelkov, S. 2016. Genetic structure of *Pyrenophora teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* populations from western Canada. European Journal of Plant Pathology 146: 325 - 335

Akhavan, A., Strelkov, S., Askarian, H., Kher, S., Fraser, M., Kutcher, H. and Turkington, K. 2017a. Sensitivity of western Canadian *Pyrenophora teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* isolates to propiconazole and pyraclostrobin. Canadian Journal of Plant Pathology 39: 11-24.

Akhavan, A., Strelkov, S., Kher, S., Askarian, H., Tucker, J., Legge, W., Tekauz, A and Turkington, T. 2017b. Resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* in Canadian Barley Genotypes. Crop Science 57: 151-160.

Albertini, L., Barrault, G., Sarrafi, A. and Caron, D. 1995. Investigations in the ethiology, biology, epidemiology and control of the causal agents of barley leaf blights in France. Rachis 14: 13 - 25.

Al-Tikrity, M. 1987. A simple technique for production of *Drechslera teres* spores. Transactions of the British Mycological Society 89: 402-402.

Arabi, M., Al-Safadi, B. and Charbaji, T. 2003. Pathogenic variation among isolates of *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. Journal Phytopathology 151: 376 – 382.

Avozani, A. 2011. Sensibilidade de *Corynespora cassiicola*, isolados da soja, a fungicidas *in vitro*. Tesis de maestría, Universidad de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil. 121 p.

Baker, K. 1972. Germination control, Metabolism, and Pathology. Pp. 317 - 416 in Kozlowski, T (ed) Seed Biology. University of Wisconsin, Surrey.

Barba, J., Reis, E. e Forcelini, C. 2002. Comparação de métodos para detecção de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de cevada. Fitopatologia Brasileira 27: 389-394.

Bartlett, D., Clough, J., Godfrey, C., Godwin, J., Hall, A., Heaney, S and Maund, S. 2001. Understanding the strobilurin fungicides. Pesticide outlook 12: 143-148.

Barlett, D., Clough, J., Godwin, J., Hall, A., Hamer, M. and Parr-Dobrzanski, B. 2002. Review: The strobilurin fungicides. Pest Management Science 58: 649-662.

Barreto, D y Carmona, M. 1993. Microflora of barley and malt in Argentina. Proceedings 1st. ISTA Plant Disease Committee Symposium on Seed Health Testing Pp. 70-74. Ottawa, Canadá.

Barreto, D., Carmona, M., Ferrazini, M and Pérez, B. 2000. Reaction of *Hordeum distichum* to *Pyrenophora teres* in Argentina. Revista de Investigaciones Agropecuarias 29: 107-115.

Beard, C., Loughman, R., Smith, A. and Speijers, J. 2009. Baseline sensitivity to three triazole fungicides in *Pyrenophora tritici-repentis*. Australian Plant Pathology 38: 168–172.

Beckerman, J. 2013. Detection of Fungicide Resistance. Pp. 281 - 310 in Nita, M. (ed) Fungicides - showcases of integrated plant disease management from around the world. Intechopen. Available from: www.intechopen.com/books/fungicides-showcases-of-integrated-plant-disease-management-from-around-the-world/detection-of-fungicide-resistance

Biology Online Dictionary. <https://www.biology-online.org/>, acceso 2018.

Brent, K and Hollomon, D. 2007a. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? FRAC Monograph No. 1. FRAC, Brussels, Belgium. 57p.

Brent, K and Hollomon, D. 2007b. Fungicide resistance in crop pathogens: The assessment of risk. FRAC Monograph No. 2. FRAC, Brussels, Belgium. 53p.

Brown, M. Steffenson, B and Webster, R. 1993. Host range of *Pyrenophora teres* isolates from California. Plant Disease 77: 942-947.

Burleigh, J., Tajani, M and Seck, M. 1988. Effects of *Pyrenophora teres* and weeds on barley yield and yield components. Phytopathology 78: 295-299.

Campbell, G and Crous, P. 2002. Fungicide sensitivity of South African net and spot type isolates of *Pyrenophora teres* to ergosterol biosynthesis inhibitors. Australian Plant Pathology 31:151-155.

Carmona, M., Barreto, D y Wright, E. 1992. Relevamiento de las enfermedades fúngicas de la cebada cervecera en la Provincia de Buenos Aires. Revista Facultad de Agronomía 13: 187-192.

Carmona, M y Barreto, D. 1995. Enfermedades fúngicas de la cebada cervecera en la Pcia. de Bs. As. en 1991. Fitopatología Brasileira 20:509 - 510.

Carmona, M., Lopez, S y Barreto D. 1996. Ocurrencia de los estados teleomorfo y picnidial de *Pyrenophora teres* en cebada en la Argentina. Fitopatología Brasileira 21: 394.

Carmona, M. Barreto, D and Reis, E. 1999. Detection, transmission and control of *Drechslera teres* in barley seed. Seed Science and Technology 27:761- 769.

Carmona, M., Barreto, D y Reis, E. 2001. Efecto del fungicida iprodione y sus mezclas con thiram y triticonazole en el control de *Drechslera teres* en semillas de cebada. Fitopatología Brasileira. 26:176 - 179.

Carmona, M., Zweegman, J and Reis, E. 2004. Detection and transmission of *Drechslera avenae* from oat seed. Fitopatología Brasileira 29: 319-321.

Carmona, M., Ferrazini, M and Barreto, D. 2006. Tan spot of wheat caused by *Drechslera tritici repentis*: Detection transmission and control in wheat seed. Cereal Research Communications 34:1043-1049.

Carmona, M. 2008a. Manual para la Identificación y Manejo de las Enfermedades del Cultivo de Cebada. Horizonte A, Buenos Aires.

Carmona, M. 2008b. Manejo integrado de las principales enfermedades de la cebada cervecera: el caso de las manchas foliares. En: XIV Congreso de AAPRESID. Pp 297-305

Carmona, M. y Barreto, D. 2008. Manejo integrado de enfermedades del cultivo de cebada cervecera. Aapresid.

Disponibile en:
www.agroconsultasonline.com.ar/ticket.html/enfermedades%20de%20la%20cebada%202008.pdf?op=d&ticket_id=6980&evento_id=14326

Carmona, M., Barreto, D., Moschini, R and Reis, E. 2008. Epidemiology and control of seed borne *Drechslera teres* on barley. Cereal Research Communications 36: 637-645.

Carmona, M., Barreto, D y Romero, A. 2011. Enfermedades del cultivo de cebada. Importancia, síntomas y manejo. Pp. 133-169 en Miralles, D., Benech-Arnold, R. y Abeledo, L (eds) CEBADA CERVECERA: Bases funcionales para un mejor manejo del cultivo”.

Carmona, M y Sautua, F. 2015. Manual práctico para el diagnóstico de enfermedades foliares y su control con fungicidas en los cultivos de trigo y cebada. FAUBA-BASF. 85 p.

Carmona, M. y Sautua, F. 2016. Manejo químico de las enfermedades del cultivo de cebada cervecera en Argentina. Pp 95-123. En Kiehr M *et al* (Eds) Enfermedades de cebada en Argentina. Diagnóstico y manejo.

Carmona, M y Sautua F. 2017. La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. Revista Agronomía & Ambiente 37: 1-19.

Carmona, M., Sautua, F., Scandiani, M., Bello, R., Lopez, V. and Luque, A. 2017. *In vitro* sensitivity assessment of late season soybean pathogens to fungicide mixtures. Australian Plant Disease 12: 20.

Carolan, K., Helps, J., van den Berg, F., Paveley, N and van den Bosch, F. 2017. Extending the durability of cultivar resistance by limiting epidemic growth rates. Proceedings of the Royal Society B 284.

Cattaneo, M. 2001. Información cosecha 2000/2001- Argentina. Pp. 113-119 in Minella, E (Ed) Reunión Anual de Pesquisa de cevada (21). EMBRAPA Trigo, Passo Fundo, Brasil.

- Cattaneo, M. 2018a. ¿Cómo viene la campaña 2018/19 de cebada? Disponible en: www.cebadacervecera.com.ar.
- Cattaneo, M. 2018b. Comportamiento sanitario en cultivo de variedades de cebada. Disponible en: www.cebadacervecera.com.ar.
- Cattaneo, M. 2019. Distribución varietal de cebada en Argentina. Disponible en: www.cebadacervecera.com.ar.
- Chen, Y., Zhang, A., Wang, W., Zhang, Y and Gao, T. 2012. Baseline sensitivity and efficacy of thifluzamide in *Rhizoctonia solani*. Annals of Applied Biology 161: 247–254.
- Colcol, J. and Baudoin, A. 2016. Sensitivity of *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola* in Virginia to QoI fungicides, Boscalid, Quinoxifen, Thiophanate methyl and mefenoxam. Plant Disease 100: 337-344.
- Corio-Costet, M. 2015. Monitoring Resistance in obligate pathogens by bioassays relating to field use: grapevine powdery and downy mildews. Pp. 251-279 in Ishii, H and Hollomon, D (eds.) Fungicide Resistance in Plant Pathogens, Principles and a Guide to Practical Management. Springer, Japan.
- Chidambaram, P., Mathur, S. and Neergaard, P. 1973. Identification of seed-borne *Drechslera* species. Pp.105-208 in Buchwald, N (ed). Nordisk Mycologisk Tidsskrift. Friesia, Copenhagen.
- De Rossi, R., Reis, E and Brustolin, R. 2015a. Fungicide baseline for mycelial sensitivity of *Exserohilum turcicum*, causal agent of northern corn leaf blight. Summa Phytopathologica 41:25-30.
- De Rossi, R., Reis, E and Brustolin, R. 2015b. Morfologia de conídios e patogenicidade de isolados de *Exserohilum turcicum* da Argentina e do Brasil em milho. Summa Phytopathologica 41: 58-63.
- De Temple, J. 1970. Routine methods for determining the health condition of seeds in the seed testing station. Proceedings of the International Seed Testing Association 35: 257-296.
- Deadman, M. and Cooke, B. 1985. A method of spore production for *Drechslera teres* using detached barley leaves. Transactions of the British Mycological Society 85: 489-493.
- Deising, H., Reimann, S and Pascholati, S. 2008. Mechanisms and significance of fungicide resistance. Brazilian Journal of Microbiology 39: 286-295.
- Delp, C. and Dekker, J. 1985. Fungicide resistance: Definitions and use of terms. Bulletin 15: 333-335.
- Douiyyssi, A., Rasmusson, D. and Roelfs, A. 1998. Responses of Barley Cultivars and Lines to Isolates of *Pyrenophora teres*. Plant Disease 82: 316-321.
- Edgington, L., Khew, K. and Barrow, G. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology 61: 42- 44.

El Yousfi, B and Ezzahiri, B. 2002. Net blotch in semi-arid regions of Morocco II yield and yield-loss modeling. *Field Crops Research* 73: 81-93.

Eldiaonline. www.eldiaonline.com, acceso 2018.

Ellwood, S., Piscetek, V., Mair, W., Lawrence, J., Lopez-Ruiz, F and Rawlinson, C. 2018. Genetic variation of *Pyrenophora teres* f. *teres* isolates in Western Australia and emergence of a *Cyp51A* fungicide resistance mutation. *Plant Pathology*

Fernández, E. 2018. Detección de patógenos en semillas de cebada. Tesis de grado. Universidad de Buenos Aires. 47p.

Fernández-Ortuño, D., Torres, J., de Vicente, A. and Pérez-García. 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology* 11:1-9.

Ferrazzini, M. 1996. Reacción a la mancha en red (*Pyrenophora teres*) de cultivares, líneas avanzadas e introducciones de la cebada cervecera. Tesis de Grado. Universidad de Buenos Aires. 62 p.

Figueiró, M. e Reis, E. 2009. Comparação da sensibilidade de métodos para a detecção de fungos patogênicos em sementes de aveia branca e preta no Rio Grande do Sul. *Tropical Plant Pathology* 34: 265-269.

Fisher, N., Brown, A., Sexton, G., Cook, A., Windass, J., and Meunier, B. 2004. Modeling the Qo site of crop pathogens in *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b. *European Journal of Biochemistry* 271: 2264–2271.

FRAC (fungicide resistance action committee), Crop Life. www.frac.info, acceso 2018.

FRAC (fungicide resistance action committee), Crop Life. www.frac.info, acceso 2019.

Frazzon, A., Matsumura, A., and Van Der Sand, S. 2002. Morphological characterization and genetic analysis of *Drechslera teres* isolates. *Genetics and Molecular Biology* 25: 235 – 241.

Galano, T., Fininsa, C and Bultosa, G. 2008. Effects of net blotch (*Pyrenophora teres*) on malt barley yield and grain quality at Holeta, Central Ethiopia. *East African Journal of Sciences* 2:150-158.

Garcia, D., Vechiato, M. e Machado, J. 2008. Comparação de métodos para a detecção de *Fusarium graminearum* em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Summa Phytopathologica* 34: 164-167.

Georgopoulos, S. 1982. Genetical and biochemical backgrounds of fungicide resistance. Pp. 46-52 in Dekker, J and Georgopoulos, S (eds.) *Fungicide Resistance in Crop Protection*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.

Gilchrist, L., Fuentes, G., Martínez, C., López, R., Duveiller, E., Singh, R., Henry, M. y García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades en trigo y cebada. CIMMYT, México, D.F. 68 p.

Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A and Gisi, U. 2006. Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science* 62: 465 - 472.

Gubiš, J., Hudcovicová, M., Klčová, L. Červená, V., Bojnanská, K. and Kraic, J. 2004. Detection of leaf blotches – causal agents in barley leaves and grains. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 40 :111–117.

Gullino, M., Leroux, P and Smith, C. 2000. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection* 19: 1-11.

Hampton, J and Arnst, B. 1978. The relationship between net blotch and yield loss in spring barley. Pp. 181–184 in *Epidemiology and crop loss assessment*. An Australasian Plant Pathology Society workshop, Lincoln College, Canterbury, New Zealand.

Hampton, J. 1980. The role of seed-borne inoculum in the epidemiology of net blotch of barley in New Zealand. *Journal of Experimental Agriculture* 8: 297-299.

Han, X., Zhao, H., Ren, W., ChiYuan, L. and Chen, C. 2017. Resistance risk assessment for fludioxonil in *Bipolaris maydis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 139: 32-39.

Heaney, S., Hall, A., Davis, S and Olaya, G. 2000. Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross resistance group: current perspectives. In *The BCPC Conference: Pests and disease*. Pp. 755-762.

Hysing, S. and Wiik, L. 2013. The role of seed infection level and fungicide seed treatments in control of net blotch in barley. *European Journal Plant Pathology* 137: 169 – 180.

Hobbelen, P., Paveley, N., Oliver R. and van den Bosch, F. 2013. The usefulness of concurrent, alternating and mixture use of two high-risk fungicides for delaying the selection of resistance in populations of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat. *Phytopathology* 103: 690 –707.

Hollomon, D. 2015. Fungicide Resistance: 40 Years on and Still a Major Problem. Pp. 3-11 in Ishii, H and Hollomon, D (eds.) *Fungicide Resistance in Plant Pathogens, Principles and a Guide to Practical Management*. Springer Japan.

Hundie, B., Sangchote, S and Sarobol, E. 2004. Barley Net Blotch (*Pyrenophora teres* Drechs) Epidemiology and Management. *Kasetsart Journal Natural Science* 38: 380 - 392

Hunger, R and Brown, D. 1987. Colony color, growth, sporulation, fungicide sensitivity, and pathogenicity of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Disease* 71: 907-910.

Ishi, I. 2006. Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and Agricultural Environment. *Journal Agricultural Research Quarterly* 40: 205-211.

Ishii, H., and Hollomon, D. 2015. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management*. Tokyo: Springer.

- Ishii, H., Zhen, F., Hu, M., Li, X and Schnabel, G. 2016. Efficacy of SDHI fungicides, including benzovindiflupyr, against *Colletorichum* species. Pest Management Science 72: 1844-1853.
- Jalli, M. 2010. The virulence of Finish *Pyrenophora teres* f. *teres* isolates and its implications for resistance breeding. Tesis Doctoral, Univeristy of Helsinki. 45 p.
- James, C. 1971. An illustrated series of assessment keys for plant diseases their preparation and usage. Canadian Plant Disease Survey 51: 39
- Jayasena, K. Loughman, R and Majewski, J. 2002. Evaluation of fungicides in control of spot-type net blotch on barley. Crop Protection 21: 63–69.
- Jonsson, R., Bryngelsson, T. and Gustafsson, M. 1997. Virulence studies of Swedish net blotch isolates (*Drechslera teres*) and identification of resistant barley lines. Euphytica 94: 209–218.
- Jordan ,V., Best, G. and Allen, E. 1985. Effects of *Pyrenophora teres* on dry matter production and yield components of winter barley. Plant Pathology 34: 200-206.
- Jorgensen, J. 1983. Disease testing of barley seed and application of test results in Denmark. Seed Science and Technology. 11: 615-624.
- Jorgensen, L., Pinnschmidt, H., Nielsen, B. and Nielsen, G. 2004. Biology and control of Barley Net Blotch (*Pyrenophora teres*). Grøn Viden Markbrug: 289.
- Karakaya, A and Akyol, A. 2006. Determination of the seedling reactions of some Turkish barley cultivars to the net blotch. Plant Pathology Journal 5: 113-114.
- Kiehr, M., Wehrhahne, M., Daddario, J., Storm, A y Delhey, R. 2016. Enfermedades de la cebada. Pp 17 – 74. En Kiehr M et al (Eds) Enfermedades de cebada en Argentina. Diagnóstico y manejo.
- Kim, Y., Dixon, E., Vincelli, P and Farman, M. 2003. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. Phytopathology 93: 891–900.
- Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H., Pradier, J., Leroux, P., De Waard, M and Hahn, M. 2009. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. Plos Pathogens 5: 1 – 13.
- Klix, M., Verreet, J and Beyer, M. 2007. Comparison of declining triazole sensitivity of *Gibberella zeae* achieved by advances in triazole fungicide development. Crop Protection 26: 683-690.
- Kosiada, T. 2008. Influence of temperature and daylight length on barley infection by *Pyrenophora teres*. Journal of Plant Protection Research 48: 9 - 15.
- Kühne, S., Burth, U y Marx, P. 2011. Cuidado de cultivos biológicos al aire libre. 300 p. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=K5OA63b5I7EC&pg=PA56&dq=mancha+en+re>

[d+de+la+cebada&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj8tXGjZnMAhWJF5AKHaknB6UQ6AEIGjAA#v=onepage&q=mancha%20en%20red%20de%20la%20cebada&f=false](https://www.lanacion.com.ar/d+de+la+cebada&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj8tXGjZnMAhWJF5AKHaknB6UQ6AEIGjAA#v=onepage&q=mancha%20en%20red%20de%20la%20cebada&f=false)

Kumar, A., Solanki, I. and Kumari, S. 2014. Management of foliar blight (Spot Blotch) of wheat the most threatening disease of north eastern plain zone (NEPZ) through chemicals. *Journal of Agroecology and Natural Resource Management* 1:4-6.

La Nación. www.lanacion.com.ar, acceso 2018.

Leadbeater, A. 2012. Fungicide resistance in crop protection: Risk and Management. Resistance risk to QoI fungicides and anti-resistance strategies. 284 p.

Lehmensiek, A., Bester-van der Merwe, A., Sutherland, M., Platz, G., Kriel, W., Potgieter and G., Prins, R. 2010. Population structure of South African and Australian *Pyrenophora teres* isolates. *Plant Pathology* 59: 504 – 515.

Leisova, L., Minarikova, V., Kucera, L and Ovesna, J. 2006. Quantification of *Pyrenophora teres* in infected barley leaves using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 67: 446 – 455.

Lightfoot, D and Able, A. 2010. Growth of *Pyrenophora teres* in planta during barley net blotch disease. *Australasian Plant Pathology* 39: 499 – 507.

Limonard, T. 1966. A modified blotter test for seed health. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 72: 319-321.

Liu, Z., Ellwood, S., Oliver, R. and Friesen, T. 2011. *Pyrenophora teres*: profile of an increasingly damaging barley pathogen. *Molecular Plant Pathology* 12: 1-19.

Locke, T. 2000. Barley net blotch: Survey of sensitivity of *Pyrenophora teres* to fungicides. HGCA Project report N°227. 12p.

Louw, J., Crous, P. and Holz, G. 1996. Relative importance of the barley net blotch pathogens *Pyrenophora teres* f. *teres* (net-type) and *P. teres* f. *maculata* (spot-type) in South Africa. *African Plant Protection* 2: 89 – 95.

Lucas, J., Hawkins, N. and Fraaije, B. 2015. The Evolution of Fungicide Resistance. *Advances in Applied Microbiology* 90: 29-92.

Lu24(Radio Tres Arroyos). www.lu24.com.ar, acceso 2018.

MAGyP. 2016. Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación. Dirección de Mercados Agrícolas. Disponible en: www.agroindustria.gob.ar. Consultado el 9 de enero de 2018.

Mahapatra, S and Das, S. 2013. Efficacy of different fungicides against spot blotch of wheat in Terai region of West Bengal. *Journal of Wheat Research* 5:18-21.

Mahmoud, Y. Aly, A. Omar, M and Ismail, A. 2006. Variation in sensitivity among some isolates of *Macrophomina phaseolina* isolated from cotton roots to flutolanil fungicide. *Microbiology* 34: 99-103.

- Mair, W., Deng, W., Mullins, J., West, S., Wang, P., Besharat, N., Ellwood, S., Oliver, R. and Lopez-Ruiz, F. 2016. Demethylase inhibitor fungicide resistance in *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* associated with target site modification and inducible overexpression of *Cyp51*. *Frontiers in Microbiology* 7: 1279.
- Manandhar, H., Jørgensen, H., Smedegaard-Petersen, V and Mathur, S. 1998. Seedborne infection of rice by *Pyricularia oryzae* and its transmission to seedlings. *Plant Disease* 82: 1093 – 1099.
- Marcinkowska, J. 2002. Methods of finding and identification of pathogens in seed. *Plant Breeding and Seed Science* 46: 31-48.
- Marzani, Q. 2011. Fungicide resistance and efficacy for control of *Pyrenophora teres* and *Mycosphaerella graminicola* on barley and wheat. Tesis Doctoral, University of Nottingham. 222 p.
- Marzani, Q., Swarbrick, P. and Rossall, S. 2013. Correlation of the F129L mutation in *Pyrenophora teres*, the pathogen of net blotch of barley, with the efficacy of QoI fungicides. *Journal of Agricultural and Veterinary Science* 3: 66 -72.
- Mathre, D. 1997. Compendium of Barley Diseases. American Phytopathological Society
- McKay, A., Hagerty, G., Follas, G., Moore, M., Christie, M. and Beresford, R. 2011. Succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicide resistance prevention strategy. *New Zealand Plant Protection* 64: 119 -124.
- McLean, M., Howlett, B. and Hollaway, G. 2010. Spot form of net blotch, caused by *Pyrenophora teres* f. *maculata*, is the most prevalent foliar disease of barley in Victoria, Australia. *Australasian Plant Pathology* 39: 46-49.
- Menegon, A., Forcelini, C. e Fernandes, J. 2005. Expansão de lesão por manchas foliares em cevada e sua interação com a aplicação foliar de fungicidas. *Fitopatologia Brasileira* 30: 134-138.
- MycoBank (Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks), International Mycological Association. www.mycobank.org, acceso 2018.
- Moschini, R., Carmona, M., Barreto D. y Conti H. 1996. Modelos basados en variables meteorológicas para predecir la incidencia de la mancha en red de la cebada cervecera: Evaluación del potencial climático respecto a la enfermedad. *Fitopatología Brasileira* 21: 373-380.
- Nameth, S. 1998. Priorities in seed pathology research. *Scientia Agricola* 55: 94-97.
- Nakova, M. 2009. Barley net blotch. *Agricultural Sciences* 1: 45-49
- Neergard, P. 1977. Seed pathology. Editorial John Wiley. New York. 839p.
- Olutoyosi, O., Butts, C. and Bradley, C. 2016. Sensitivity of *Rhizoctonia solani* to succinate dehydrogenase inhibitor and demethylation inhibitor fungicides. *Plant Disease* 101: 487- 495

Ora, N., Faruq, A., Islam, M., Akhtar, N. and Rahman, M. 2011. Detection and identification of seed borne pathogens from some cultivated hybrid rice varieties in Bangladesh. Middle-East Journal of Scientific Research 10: 482-488.

Ordon, F., Afanasenko, O., Mironenko, N., Filatova, O., Kopahnke, D. and Kramer, I. 2007. Genetics of host-pathogen interactions in the *Pyrenophora teres* f. *teres* (net form) - barley (*Hordeum vulgare*) pathosystem. European Journal of Plant Pathology 117: 267-280.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2004. BARLEY: Post-Harvest Operations. Ankara, Turkey. Disponible en : http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_BARLEY.pdf

Owino, A., Ochuodho, J. and Were, J. 2013. Morphological diversity of net blotch fungi (*Pyrenophora teres*) infecting barley (*Hordeum vulgare*) in barley growing areas of Kenya. Journal of experimental Biology and Agricultural Sciences 1: 473-479

Pană, M., Cristea, S., Manole, S., Cernat, S., Zala, C. and Berca, L. 2015. Research on the influence of temperature, light and culture media on growth and development of *Pyrenophora teres* fungus (*in vitro*). Lucrări Științifice 58.

Pasche, J., Wharam, C., Gudmestad, N. 2002: Shift in sensitivity of *Alternaria solani* (potato early blight) to strobilurin fungicides. In: The BCPC Conference Pests and Diseases, 2002, Pp. 841–846. The British Crop Protection Council, Alton, Hampshire, UK.

Pasche, J. Wharam, C. and Gudmestad, N. 2004. Shift in Sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI fungicides. Plant Disease 88: 181-187.

Patel, J., Manhardt, S., Slerotzki, H., Stammeler, G., Gudmestad, N. and Adhikari, T. 2011. A Two-Step Molecular Detection Method for *Pyrenophora tritici-repentis* Isolates Insensitive to QoI Fungicides. Plant Disease 95: 1558-1564.

Patel, J. Meinhardt, S. Gudmestad, N and Adhikari, T. 2012. Pyraclostrobin sensitivity of baseline and fungicide exposed isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. Crop Protection 34: 37-41.

Peever, T. and Milgroom, M. 1994. Lack of correlation between fitness and resistance to sterol biosynthesis-inhibiting fungicides in *Pyrenophora teres*. Phytopathology 84: 515-519.

Pereyra, S. 1996. Estrategias para el control químico de enfermedades en cebada. Boletín de divulgación N°57, INIA. Montevideo, Uruguay. pp 2. Disponible en: www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219240807160149.pdf

Petkar, A., Langston, D., Buck, J., Stevenson, K. and Ji, P. 2017. Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f.sp *niveum* to prothioconazole and thiophanate-methyl and gene mutation conferring resistance to thiophanate-methyl. Plant Disease 101: 366 - 371.

Piening, L. 1968. Development of barley net blotch from infested straw and seed. Canadian Journal of Plant Science 48: 623- 625.

Pijls, C. and Shaw, M. 1997. Weak selection by field sprays for flutriafol resistance in *Septoria tritici*. Plant Pathology 46: 247-263.

Plant Health Australia. 2009. Net form of net blotch (exotic pathotypes) *Pyrenophora teres* f. sp. *teres*: Contingency Plan – Net form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. sp. *teres*). Available in www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2013/03/Net-form-of-net-blotch-CP-2009.pdf

Pokorny, A., Smilanick, J., Xiao, C., Farrar, J and Shrestha, A. 2016. Determination of fungicide resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry in the Central Coast Region of California. Plant Health Progress 17: 30 – 34.

Rehfus, A., Miessner, S., Achenbach, J., Strobel, D., Bryson, R and Stammeler, G. 2016. Emergence of succinate dehydrogenase inhibitor resistance of *Pyrenophora teres* in Europe. Pest Management Science 72: 1977-1988.

Rehfus, A. 2018. Analysis of the emerging situation of resistance to succinate dehydrogenase inhibitors in *Pyrenophora teres* and *Zymoseptoria tritici* in Europe. Tesis doctoral, Universität Hohenheim. 195 p.

Reis, E. 1983. Selective medium for isolating *Cochliobolus sativus* from soil. Plant Disease 67:68-70.

Reis, E. 1991. Mancha en red de la cebada: Biología, epidemiología y control de *Drechslera teres*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Serie Técnica N°3. Pp 8-10. Disponible en: www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807104540.pdf

Reis, E e Forcelini, C. 1993. Transmissão de *Bipolaris sorokiniana* de sementes para órgãos radiculares e aéreos do trigo. Fitopatologia Brasileira 18: 76-81.

Reis, E., Casa, M., Casa, R., Blum, M., Carmona, M e Barreto, D.1997. Sensibilidade de *Drechslera teres* ao fungicida triadimenol usado em tratamento de sementes de cevada. Fitopatologia Brasileira 22: 539-542.

Reis, E. Barreto, D. y Carmona, M. 1999a. Patógenos de semillas de cereales de invierno.100 p.

Reis, E., Reis, A., Casa, R. and Blum, M. 1999b. Comparison of methods to detect leaf and head blighting fungi in small grain seeds. Summa Phytopathologica 25: 364-367.

Reis, E. y Carmona, M. 2006. Bases para el manejo integrado de enfermedades en sistemas de siembra directa. Actas XIV Congreso AAPRESID. Pp.11-26.

Reis, E., Reis, A. e Carmona, M. 2010. Manual de fungicidas. Controle químico de doenças de plantas. Universidade de Passo Fundo (Ed), Passo Fundo, Brasil. Pp. 28-29.

Reis, E e Carmona, M. 2011. Sensibilidade de raças de *Puccinia triticina* a fungicidas. En II Simposio Nacional de Agricultura. Brasil.

- Reis, E and Carmona, M. 2013. Classification of fungicides. Pp. 91-104 in Wheeler, M and Johnston, B (eds) Fungicides: Classification. Role in Disease Management and Toxicity Effects. Editorial Nova Science Publishers, Hauppauge, NY.
- Reis, E., Zanatta, T, y Danelli, A. 2014. Effect of the concentration of inoculum and tensoactive on the efficiency of *Bipolaris sorokiniana* infection in wheat leaves. Summa Phytopathology 40: 178 – 181.
- Russell, P. 2004. Sensitivity baselines in fungicide resistance Research and Management. FRAC Monograph No 3. Crop Life International FRAC, Brussels, Belgium. 56p.
- Sarpeleh, A., Tate, M., Wallwork, H., Catcheside, D. and Able, A. 2009. Characterisation of low molecular weight phytotoxins isolated from *Pyrenophora teres*. Physiological and Molecular Plant Pathology 73: 154-162.
- Schmitz, H., Medeiros, C., Craig, I. and Stammer, G. 2013. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-oxidoreductase-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. Pest Management Science 70: 378 – 388.
- Scott, B. 1992. Assessment of resistance in barley to *Pyrenophora teres* and *Pyrenophora japonica*. Crop Protection 11: 240-242.
- Statkevičiūtė, G., Brazauskas, G., Semaškienė, R., Leistrumaitė, A and Dabkevičius, Z. 2010. *Pyrenophora teres* genetic diversity as detected by ISSR analysis. Žemdirbystė Agriculture 97: 91 – 98.
- Semar, M., Strobel, D., Koch, A., Klappach, K. and Stammer, G. 2007. Field efficacy of pyraclostrobin against populations of *Pyrenophora teres* containing the F129L mutation in the cytochrome b gene. Journal of Plant Diseases and Protection 3: 117-119.
- Shipton, W., Khan, T., Boyd, W. 1973. Net blotch of barley. Review of Plant Pathology 52: 269-290.
- Sierotzki, H., Wulschleger, J and Gisi, U. 2000. Point-mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. Pesticide Biochemistry and Physiology 68:107-112.
- Sierotzi, H., Frey, R., Wulschleger, J., Palermo, S., Karli, S., Godwin, J. and Gisi, U. 2007. Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. Pest Management Science 63: 225-233.
- Sierotzki, H and Scalliet, G. 2013. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. Phytopathology 103: 880 – 887.
- Smedegard-Petersen, V. 1971. *Pyrenophora teres* f. *maculata* f. nov. and *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley in Denmark. Aarsskrift Kongelige Veterinær og Landbohøjskole: 124-144.

- Smedegaard-Petersen, V. 1972. The perithecial and pycnidial stages of *Pyrenophora teres* and *Pyrenophora graminea* in Denmark. *Friesia* 10: 61-85.
- Spolti, P., Del Ponte, E., Dong, Y., Cummings, J. and Bergstrom, G. 2014. Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Disease* 98: 607-613.
- Stammler, G., Cordero, J., Koch, A., Semar, M. and Schlehuber, S. 2009. Role of the Y134F mutation in *cyp51* and overexpression of *cyp51* in the sensitivity response of *Puccinia tritricina* to epoxiconazole. *Crop Protection* 28: 891-897.
- Stammler, G., Rehfus, A., Prochnow, J., Bryson, R. and Strobel, D. 2014a. New findings on the development of insensitive isolates of *Pyrenophora teres* towards SDHI fungicides. *Julius-Kühn-Archiv* 447, 568.
- Stammler, G., Miessner, S and Koch, A. 2014b. Pathogens with low QoI resistance risk. Pp. 145. In Dehne, H., Deising, H., Fraaije, B., Gisi, U., Hermann, D., Mehl, A., Oerke, E., Russell, P., Stammler, G., Kuck, K., Lyr, H (Eds) "Modern Fungicides and Antifungal Compounds". Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig.
- Stammler, G., Wolf, A., Glaettli, A. and Klappach, K. 2015. Respiration Inhibitors: Complex II. Pp 105 – 117 in Ishii H. and Hollomon D. (eds) *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer, Tokyo.
- Staub, T. 1991. Fungicide resistance: Practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annual Reviews Phytopathology* 29: 421-442.
- Steffenson, B., Webster, R. and Jackson, L. 1991. Reduction in yield loss using incomplete resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* in barley. *Plant Disease* 75: 96-100.
- Stolte, R. 2006. Sensibilidade de *Bipolaris sorokiniana* e de *Drechslera tritici-repentis* a fungicidas ‘*in vitro*’. Tesis de Maestría, Universidad de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil. Pp 50-57.
- Suzuki, F., Yamaguchi, J., Koba, A., Nakajima, T. and Arai, M. 2010. Changes in Fungicide Resistance Frequency and Population Structure of *Pyricularia oryzae* after Discontinuance of MBI-D Fungicides. *Plant Disease* 94: 329-334.
- Taga, M., Waki, T., Tsuda, M. and Ueyama, A. 1982. Fungicide sensitivity and genetics of IBP-resistant mutants of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 72: 905-908.
- Thomas, M. 1984. A simple method for producing suspensions of *Pyrenophora teres* spores. *Bulletin of the British Mycological Society* 18: 60-61.
- Tomerlin, J and Howell, T. 1988. DISTRAIN: a computer program for training people to estimate severity on cereal leaves. *Plant Disease* 72: 455-459.
- Tonin, R., Reis, E y Gómez, D. 2015. Sensibilidad a fungicidas *in vitro* de micelios de *Drechslera siccans* aislada a partir de trigo. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 41: 192-200.

- Tonin, R., Reis, E and Avozani, A. 2017. Reduction in the in vitro sensitivity of *Drechslera tritici-repentis*, isolated from wheat, to strobilurin and triazole fungicides. *Summa Phytopathologica* 43: 20-25.
- Tuohy, J., Jalli, M., Cooke, B. and Sullivan, E. 2006. Pathogenic variation in populations of *Drechslera teres* f. *teres* and *D. teres* f. *maculata* and differences in host cultivar responses. *European Journal of Plant Pathology* 116: 177 – 185.
- Tóth, B., Csősz, M., Kopahnke, D. and Varga, J. 2008. First report on *Pyrenophora teres* causing lesions of wheat leaves in Hungary. *Plant Pathology* 57: 385.
- Tsedaley, B. 2015. Review on seed health tests and detection methods of seedborne diseases. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 5: 176-184.
- Twizeyimana, M. and Hartman, G. 2017. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates to fungicides and reduction of fungal infection based on fungicide and timing of application. *Plant Disease*. 101: 121-128.
- Tylkowska, K., Serbiak, P and Szopinska, D. 2015. Incubation methods for the detection of fungi associated with caraway (*Carum carvi* L.) seeds. *Herba Polonica Journal* 61: 9-22.
- United States Department of Agriculture. 2018. Grain: World Markets and Trade. En: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain.pdf>
- van den Berg, C. 1988. Epidemiology of *Pyrenophora teres* and its effect on grain yield of *Hordeum vulgare*. Thesis of Doctor Philosophy, University of Saskatchewan. 187 p.
- van den Berg, C. and Rossnagel, B. 1991. Epidemiology of spot-type net blotch on spring barley in Saskatchewan. *Phytopathology* 81: 1446-1452.
- van den Bosch, F., Paveley, N., Shaw, M., Hobbelen, P and Oliver, R. 2011. The dose rate debate does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose? *Plant Pathology* 60: 597-606.
- Waller, J and Cannon, P. 2002. Fungi as plant pathogens. Pp. 75-93 in Waller, J., Lenné, J and Waller, S (eds.) *Plant Pathologist's pocketbook*. CABI Publishing, London.
- Warham, E. 1990. Effect of *Tilletia indica* infection on viability, germination and vigour of wheat seed. *Plant Disease* 74: 130-135.
- Weems, J. and Bradley, C. 2017. Sensitivity of *Exserohilum turcicum* to demethylation inhibitor fungicides. *Crop Protection* 99: 85-92.
- Were, J., Ochuodho, J., Rop, N., Omami, E., Anjichi, V., Ouma, P., Kimno, L. and Owino, A. 2016. Sensitivity of *Pyrenophora teres* pathotypes to temperature variation and effects on virulence and pathogenicity. *International Journal of Research Studies in Agricultural Sciences* 2: 8 - 13.
- Wolfe, M. 1981. Integrated use of fungicides and host resistance for stable disease control. *Philosophical transactions of the Royal Society* 295: 175-184.

Wordell Filho, J., Prestes, A. e Silva, M. 2002. Reação de cultivares de cevada a *Drechslera teres* e variabilidade patogénica de isolados do sul do Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira 37: 775-781.

Xavier, S., Koga, L., Martins, D., Canteri, M and Negrão, I. 2015. Variação da sensibilidade de populações de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas inibidores da desmetilação no Brasil. Summa Phytopathologica 41: 191-196.

Youcef-Benkada, M., Bendahmane, B., Barrault, S. and Albertini, L. 1994. Effects of inoculation of barley inflorescences with *Drechslera teres* upon the location of seed-borne inoculum and its transmission to seedlings as modified by temperature and soil moisture. Plant Pathology 43: 350-355.

Zadoks, J., Chang, T. and Konzak, C. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research 14: 415-421.

Capítulo VIII

Apéndice

Apéndice 1. Análisis de varianza no paramétrico (Kruskal -Wallis) y comparación múltiple de medias (test de Dunn) de sensibilidad *in vitro* de aislados de *D. teres* a las diferentes mezclas de fungicidas para la variable de clasificación región con el programa R (R Core Team, 2018).

Donde:

N: Norte

S: Sur

```
# Region
> dt$region <- factor(dt$region)
> levels(dt$region)
[1] "N" "S"
> kruskal.test(dt$IC50 ~ dt$region)

kruskal-wallis rank sum test

data: dt$IC50 by dt$region
kruskal-wallis chi-squared = 0.083834, df = 1, p-value = 0.7722

> dunnTest(dt$IC50 ~ dt$region, method="bonferroni")
Dunn (1964) Kruskal-wallis multiple comparison
p-values adjusted with the Bonferroni method.

  Comparison      Z    P.unadj    P.adj
1      N - S 0.2895404 0.7721678 0.7721678
```

Apéndice 2. Análisis de varianza no paramétrico (Kruskal – Wallis) y comparación múltiple de medias de Dunn de sensibilidad *in vitro* de aislados de *D. teres* a diferentes fungicidas (variables de clasificación aislado y fungicida) con el programa R.

Donde:

AZC: Azoxistrobina 20% + cyproconazole 8%

FEP: fluxapyroxad 5% + epoxiconazole 5% + piraclostrobina 8,1%

IAZ: Isopyrazam 12,5% + azoxistrobina 20%

TP: Trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17.5%

TPB: Trifloxistrobina 15% + prothioconazole 17,5% + bixafen 12,5%

```
# Fungicida

> dt$fungicida <- factor(dt$fungicida)
> levels(dt$fungicida)
[1] "AZC" "FEP" "IAZ" "TP" "TPB"
> kruskal.test(dt$IC50 ~ dt$fungicida)
```

kruskal-wallis rank sum test

```
data: dt$IC50 by dt$fungicida
Kruskal-wallis chi-squared = 73.353, df = 4, p-value = 4.443e-15
```

```
> dunnTest(dt$IC50 ~ dt$fungicida, method="bonferroni")
Dunn (1964) Kruskal-wallis multiple comparison
p-values adjusted with the Bonferroni method.
```

	Comparison	Z	P.unadj	P.adj
1	AZC - FEP	6.7853037	1.158425e-11	1.158425e-10
2	AZC - IAZ	5.1339406	2.837376e-07	2.837376e-06
3	FEP - IAZ	-1.6513631	9.866446e-02	9.866446e-01
4	AZC - TP	0.8175065	4.136391e-01	1.000000e+00
5	FEP - TP	-5.9677972	2.404779e-09	2.404779e-08
6	IAZ - TP	-4.3164342	1.585699e-05	1.585699e-04
7	AZC - TPB	5.4663933	4.592847e-08	4.592847e-07
8	FEP - TPB	-1.3189104	1.871991e-01	1.000000e+00
9	IAZ - TPB	0.3324526	7.395475e-01	1.000000e+00
10	TP - TPB	4.6488868	3.337313e-06	3.337313e-05

```
# Aislado
```

```
> dt$aislado <- factor(dt$aislado)
> levels(dt$aislado)
[1] "12T" "30T" "32T" "36T" "40T" "BT" "DT" "FT" "JT" "LT"
> kruskal.test(dt$IC50 ~ dt$aislado)
```

```
Kruskal-wallis rank sum test
```

```
data: dt$IC50 by dt$aislado
Kruskal-wallis chi-squared = 4.7304, df = 9, p-value = 0.8572
```

```
> dunnTest(dt$IC50 ~ dt$aislado, method="bonferroni")
Dunn (1964) Kruskal-wallis multiple comparison
p-values adjusted with the Bonferroni method.
```

	Comparison	Z	P.unadj	P.adj
1	12T - 30T	0.470159021	0.63824141	1
2	12T - 32T	0.262055848	0.79327839	1
3	30T - 32T	-0.208103173	0.83514841	1
4	12T - 36T	0.161858024	0.87141766	1
5	30T - 36T	-0.308300997	0.75785331	1
6	32T - 36T	-0.100197824	0.92018727	1
7	12T - 40T	-0.323716047	0.74615302	1
8	30T - 40T	-0.793875068	0.42726817	1
9	32T - 40T	-0.585771895	0.55802881	1
10	36T - 40T	-0.485574071	0.62726918	1
11	12T - BT	1.479844787	0.13891467	1
12	30T - BT	1.009685766	0.31264586	1
13	32T - BT	1.217788939	0.22330419	1
14	36T - BT	1.317986764	0.18750808	1

15	40T - BT	1.803560834	0.07130018	1
16	12T - DT	0.739922394	0.45934709	1
17	30T - DT	0.269763373	0.78734230	1
18	32T - DT	0.477866546	0.63274519	1
19	36T - DT	0.578064370	0.56322066	1
20	40T - DT	1.063638441	0.28749252	1
21	BT - DT	-0.739922394	0.45934709	1
22	12T - FT	0.639724569	0.52235168	1
23	30T - FT	0.169565549	0.86535182	1
24	32T - FT	0.377668722	0.70567671	1
25	36T - FT	0.477866546	0.63274519	1
26	40T - FT	0.963440617	0.33532645	1
27	BT - FT	-0.840120218	0.40084099	1
28	DT - FT	-0.100197824	0.92018727	1
29	12T - JT	0.015415050	0.98770106	1
30	30T - JT	-0.454743971	0.64929344	1
31	32T - JT	-0.246640798	0.80518623	1
32	36T - JT	-0.146442974	0.88357170	1
33	40T - JT	0.339131097	0.73451097	1
34	BT - JT	-1.464429737	0.14307657	1
35	DT - JT	-0.724507344	0.46875432	1
36	FT - JT	-0.624309520	0.53242433	1
37	12T - LT	0.023122575	0.98155250	1
38	30T - LT	-0.447036446	0.65484875	1
39	32T - LT	-0.238933273	0.81115732	1
40	36T - LT	-0.138735449	0.88965920	1
41	40T - LT	0.346838622	0.72871256	1
42	BT - LT	-1.456722212	0.14519308	1
43	DT - LT	-0.716799819	0.47349762	1
44	FT - LT	-0.616601995	0.53749728	1
45	JT - LT	0.007707525	0.99385035	1

Apéndice 3. Análisis de varianza no paramétrico (Friedman, Prueba Posthoc) para la variable FRS de los cinco fungicidas y error estándar de las medias de FRS con el programa R.

```
$`Friedman.Test`
```

```
Asymptotic General Symmetry Test
```

```
data: FRS by fungicida (AZC, FEP, IAZ, TP, TPB)
      stratified by aislado
maxT = 4.6341, p-value = 3.411e-05
alternative hypothesis: two.sided
```

```
$PostHoc.Test
```

```
FEP - AZC 1.855731e-02
IAZ - AZC 2.339270e-02
TP - AZC 2.570999e-01
TPB - AZC 3.134181e-05
IAZ - FEP 9.999929e-01
TP - FEP 8.336808e-01
```

```
TPB - FEP 5.170034e-01
TP - IAZ 8.680153e-01
TPB - IAZ 4.688806e-01
TPB - TP 6.749072e-02
```

Error estándar:

```
> #FRS - Fungicida
> group_by(FRS, fungicida) %>%
+ summarise(
+   count = n(),
+   mean = mean(FRS, na.rm = TRUE),
+   sd = sd(FRS, na.rm = TRUE),
+   std.error(FRS, na.rm = TRUE),
+   median = median(FRS, na.rm = TRUE),
+   IQR = IQR(FRS, na.rm = TRUE)
+ )
# A tibble: 5 x 7
  fungicida count mean sd `std.error(FRS, na.rm = TRUE)` median
IQR
  <fct>      <int> <dbl> <dbl>
1 AZC          9 3.07 1.72
2.12
2 FEP          9 1.02 0.327
0.53
3 IAZ          9 1.07 0.261
0.4
4 TP           9 1.32 0.513
0.400
5 TPB          9 0.807 0.362
0.43
> #FRS - Aislado
```

Apéndice 4. Análisis de varianza no paramétrico (Kruskal -Wallis Nemenyi) y comparación de medias Tukey y Kramer (Nemenyi) para la variable severidad de la mancha en red de los ensayos de sensibilidad *in vivo* con el programa R.

Donde:

T: Tratamiento

S: Severidad de la mancha en red

c("1", "2", "3", "4", "5", "6", "7", "8"): Vector de los tratamientos

```
> library(FSA)
> library(PMCMR)
> data$T = factor(data$T,
+                 levels=c("1", "2", "3", "4", "5", "6", "7", "8")
+ )
> kruskal.test(S ~ T, data = data)
```

kruskal-wallis rank sum test

data: S by T

kruskal-wallis chi-squared = 70.22, df = 7, p-value = 1.334e-12

```
> posthoc.kruskal.nemenyi.test(S ~ T, data = data, dist="Tukey")
```

Pairwise comparisons using Tukey and Kramer (Nemenyi) test
with Tukey-Dist approximation for independent samples

data: S by T

	1	2	3	4	5	6	7
2	1.0000	-	-	-	-	-	-
3	0.0013	0.0013	-	-	-	-	-
4	0.0256	0.0256	0.9932	-	-	-	-
5	1.0000	1.0000	0.0013	0.0256	-	-	-
6	1.0000	1.0000	0.0013	0.0256	1.0000	-	-
7	1.0000	1.0000	0.0013	0.0256	1.0000	1.0000	-
8	1.0000	1.0000	0.0013	0.0256	1.0000	1.0000	1.0000